

**Die Bedeutung von CEACAM3 für die
Moraxella catarrhalis-induzierte Aktivierung von
humanen Granulozyten**

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades

d o c t o r r e r u m n a t u r a l i u m

(Dr. rer. nat.)

im Fach Biologie

eingereicht an der

Lebenswissenschaftlichen Fakultät
der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Diplom-Biologin Annina Heinrich, geb. Zwanzig

Präsidentin der Humboldt-Universität zu Berlin

Prof. Dr.-Ing. Dr. Sabine Kunst

Dekan der Lebenswissenschaftlichen Fakultät

Prof. Dr. Bernhard Grimm

Gutachter/innen: 1. Prof. Arturo Zychlinsky

2. Prof. Hortense Slevogt

3. Prof. Ralf Schumann

Tag der mündlichen Prüfung: 18. Oktober 2017

1 Abkürzungsverzeichnis

A.dest	Destilliertes Wasser (<i>lat.</i> aqua destillata)
Bcl10	B-cell CLL/Lymphoma 10
BHI	Hirn-Herz Aufguss (<i>engl.</i> Brain heart infusion)
bp	Basenpaare
Card9	<i>engl.</i> Caspase-associated recruitment domain 9
cDNA	<i>engl.</i> copy DNA
CEACAM	<i>engl.</i> Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule
CFU	Kolonie-bildende Einheit (<i>engl.</i> colony-forming unit)
ChIP	Chromatin-Immunpräzipitation
COPD	Chronisch Obstruktive Lungenerkrankung (<i>engl.</i> chronic obstructive pulmonary disease)
DMEM	<i>engl.</i> Dulbeccos modified eagle medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzym-gekoppelter Immunadsorptionstest (<i>engl.</i> Enzyme-linked immunosorbent assay)
F	Phenylalanin
FBS	Fetales Rinderserum (<i>engl.</i> Fetal bovine serum)
HEK	Humane embryonale Nierenzelllinie (<i>engl.</i> Human embryonal kidney)
HPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoryltransferase 1
ITAM	<i>engl.</i> Immunoreceptor tyrosin-based activation motif
ITIM	<i>engl.</i> Immunoreceptor tyrosin-based inhibition motif
kDa	Kilo-Dalton
Malt1	<i>engl.</i> Mucosa associated lymphoid tissue lymphoma translocation gene 1
MOI	Multiplizität der Infektion (<i>engl.</i> multiplicity of infection)
MPO	Myeloperoxidase
mRNA	Boten RNA (<i>engl.</i> Messenger RNA)
NE	Neutrophile Elastase

NETs	<i>engl.</i> neutrophil extracellular traps
NF-κB	Nukleärer Transkriptionsfaktor κB
NP-40	Nonylphenoxypolyethoxylethanol
OD	Optische Dichte
PAMPs	Pathogen-assoziierte molekulare Muster (<i>engl.</i> Pathogen associated molecular patterns)
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase Kettenreaktion (<i>engl.</i> Polymerase chain reaction)
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
Pol II	Polymerase II
PRR	Muster-erkennender Rezeptor (<i>engl.</i> Pattern recognition receptor)
RIPA	Radioimmunopräzipitationsassay
RLU	Relative Lichteinheiten (<i>engl.</i> Relative light units)
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Reverse Transkriptase / Reverse Transkription
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
SNP	<i>engl.</i> single nucleotide polymorphism
Syk	<i>engl.</i> Spleen tyrosin kinase
TLR	Toll-like Rezeptor
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
Tris	2-Amino-2(hydroxymethyl)-propan-1,3-diol
UspA1	Ubiquitous surface Protein A 1
Y	Tyrosin

2 Inhaltsverzeichnis

1 Abkürzungsverzeichnis	2
2 Inhaltsverzeichnis	4
3 Zusammenfassung	7
4 Einleitung	10
4.1 Die chronisch-obstruktive Lungenerkrankung (COPD)	10
4.1.1 Die chronische Kolonisierung der Atemwege, Mikrobiom	11
4.1.2 „Vicious Circle“ Hypothese der COPD	12
4.2 Humanpathogene Erreger in der COPD	13
4.2.1 <i>Moraxella catarrhalis</i>	13
4.3 Mechanismen der angeborenen Immunabwehr	16
4.3.1 Effektorzellen	17
4.3.2 Rezeptoren der angeborenen Immunantwort	21
5 Ziele der Arbeit.....	25
6 Methodik.....	26
6.1 Material	26
6.1.1 Zelllinien und Bakterienstämme	26
6.1.2 Substanzen, Lösungen und Kits	27
6.1.3 Antikörper, Plasmide, Primer, siRNA.....	30
6.1.4 Zusammensetzung der verwendeten Puffer und Lösungen.....	33
6.1.5 sonstige Verbrauchsmaterialien	37
6.1.6 Geräte und Software.....	38
6.2 Methoden	40
6.2.1 Zellbiologische Methoden.....	40
6.2.2 Mikrobiologische Methoden	43
6.2.3 Molekularbiologische Methoden.....	46
6.2.4 Ko-Immunpräzipitation.....	51
6.2.5 Durchflusszytometrie	52
6.2.6 Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest (ELISA)	53
6.2.7 Western Blot.....	54
6.2.8 Messung der NF- κ B Aktivierung in HEK293 Zellen	55
6.2.9 Degranulationsassay – Nachweis der Myeloperoxidaseaktivität.....	56

6.2.10 Nachweis der Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies	57
6.2.11 Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH)	57
6.2.12 Elektronenmikroskopie	58
6.2.13 Statistik.....	59
7 Ergebnisse.....	60
7.1 Die Interaktion von <i>Moraxella catarrhalis</i> mit humanen Granulozyten	60
7.1.1 Clusterbildung von <i>Moraxella catarrhalis</i> auf der Zelloberfläche von humanen Granulozyten	60
7.1.2 Phagozytose von <i>Moraxella catarrhalis</i> durch humane Granulozyten.....	61
7.1.3 Intrazellulärer Nachweis biologisch aktiver Bakterien in humanen Granulozyten	62
7.2 Die Bedeutung von CEACAM3 für die proinflammatorische Immunantwort.....	64
7.2.1 Nachweis der Bindung von <i>Moraxella catarrhalis</i> UspA1 an CEACAM3 ..	64
7.2.2 Oxidativer Burst und Degranulation humaner Granulozyten nach Interaktion von <i>Moraxella catarrhalis</i> UspA1 und CEACAM3	65
7.2.3 Die Sekretion von Chemokinen und die Interaktion von <i>Moraxella</i> UspA1 und CEACAM3.....	66
7.2.4 Die Bedeutung des CEACAM3 ITAM für die <i>Moraxella</i> UspA1-induzierte CXCL8 Sekretion in NB4 Zellen	69
7.3 Untersuchung der beteiligten Signalwege der <i>Moraxella</i> UspA1-CEACAM3-induzierten CXCL8 Sekretion	72
7.3.1 Die Bedeutung der NF- κ B-Aktivierung für die <i>Moraxella catarrhalis</i> induzierte CEACAM3-Signalkaskade	72
7.3.2 Die Bedeutung der Syk Kinase für die <i>Moraxella</i> UspA1-CEACAM3-induzierte CXCL8 Sekretion.....	73
7.3.3 Die Bedeutung des Card9/Bcl10/Malt1 Signalosoms für die <i>Moraxella</i> UspA1-CEACAM3-induzierte Aktivierung von NF- κ B	76
8 Diskussion	78
8.1 Die Interaktion von <i>Moraxella catarrhalis</i> mit humanen Granulozyten	78
8.2 Die Bedeutung der <i>Moraxella</i> UspA1-CEACAM3 Interaktion für die Aktivierung humaner Granulozyten.....	80
8.3 Die Bedeutung der Granulozytenaktivierung für die Pathogenese der COPD	84
9 Ausblick.....	88
10 Literatur- und Quellenverzeichnis	89
11 Anhang	95
11.1 Anhang 1 Sequenzanalyse	95

11.2 Publikationsliste	96
11.3 Danksagung	97
11.4 Eidesstattliche Erklärung	98

3 Zusammenfassung / Summary

Zusammenfassung

Die COPD (*chronic obstructive pulmonary disease*) ist eine weltweit vorkommende, chronisch obstruktive Erkrankung der Lunge. Sie gilt als vierthäufigste Todesursache weltweit, wobei ein Viertel der akuten bakteriellen Exazerbationen auf eine Infektion mit *Moraxella catarrhalis* zurückzuführen sind. Sowohl das akute, als auch das chronische Entzündungsbild der COPD wird überwiegend durch neutrophile Granulozyten in den Atemwegen bestimmt. Wechselwirkungen, die zwischen den häufig bzw. dauerhaft anwesenden Bakterien und Leukozyten in den Atemwegen auftreten, sind bisher wenig untersucht, haben aber möglicherweise einen bedeutenden Anteil an der Pathogenese und Progression der Erkrankung.

Im Rahmen der immunologischen Infektabwehr werden Fremdorganismen nach dem Erkennen und Binden des Erregers durch Leukozyten und Makrophagen phagozytiert und abgetötet. Dabei sind neutrophile Granulozyten die ersten Leukozyten, die in das infizierte Gewebe wandern und neben antimikrobiellen Effektorfunktionen durch Freisetzung von Zytokinen auch die Entzündungsreaktion bzw. Immunantwort regulieren können. So kommt es z.B. zur Sekretion chemotaktischer Faktoren wie CXCL8 (Interleukin 8) oder CCL3 (Mip1-alpha). Diese Chemokine führen zur Rekrutierung weiterer Entzündungszellen an den Ort der Infektion.

Das gram-negative humanpathogene Bakterium *M. catarrhalis* besitzt ein spezifisches Oberflächenmolekül, das *ubiquitous surface protein A1* (UspA1), das mit hoher Affinität und Selektivität an die sogenannte N-Domäne von Rezeptoren der *carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule* (CEACAM) Familie bindet. CEACAMs sind Immunglobulin-verwandte Moleküle, die für die Vermittlung der Adhäsion zwischen einzelnen Körperzellen und an die extrazelluläre Matrix eine wichtige Rolle spielen. Es konnte gezeigt werden, dass die Bindung von UspA1 an CEACAM1, welches in der zytoplasmatischen Domäne ein *immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif* (ITIM) enthält, auf humanem Bronchialepithel eine Reduktion der Toll-like Rezeptor 2 –Antwort zur Folge hat. Im Gegensatz dazu befindet sich in der intrazellulären Domäne von CEACAM3 ein *immunoreceptor tyrosine-based activation motif* (ITAM). CEACAM3 wird ausschließlich auf humanen neutrophilen Granulozyten exprimiert. Es ist bekannt, dass eine spezifische Bindung von *M. catarrhalis* und *Neisseria gonorrhoeae* an CEACAM3 in einer Opsonin-unabhängigen Phagozytose des

Pathogens resultiert. Für *Neisseria* ist auch die CEACAM3 abhängige Induktion von antimikrobiellen Aktivitäten wie die Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies und Degranulation beschrieben. Die zytoplasmatische ITAM-like Sequenz von CEACAM3 ähnelt dem hemITAM Motiv von Dectin-1, dem Haupt- β -Glucanrezeptor in Leukozyten. Die Bindung von Liganden führt zu Tyrosinphosphorylierungen am hemITAM durch Src-Kinasen, Syk Kinase Rekrutierung und Aktivierung des Card9/Bcl10/Malt1 Komplexes. Über diesen Signalweg wird die Expression spezifischer Zytokine induziert, die eine wichtige Rolle bei der antimykotischen Immunantwort in humanen Monozyten/Makrophagen und Dendritischen Zellen spielen. Deshalb sollte in dieser Arbeit die Hypothese untersucht werden, dass *M. catarrhalis* ebenfalls in der Lage ist, durch Bindung an CEACAM3, Syk-abhängig den Card9 Signalweg und somit NF- κ B zu aktivieren und so die Zytokinantwort humaner neutrophiler Granulozyten zu verstärken. Frisch isolierte primäre Granulozyten gesunder Spender sowie NB4 Zellen wurden mit *M. catarrhalis* in Anwesenheit verschiedener Inhibitoren, siRNA oder CEACAM-blockender Antikörper infiziert und anschließend die Chemokinkonzentration in den Zellkulturüberständen bestimmt. Mittels eines Luziferase Reporterassays und Chromatinimmunpräzipitation wurde die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B untersucht. Zusätzlich wurde der Einfluss der Bakterien auf die Aktivierung der neutrophilen Granulozyten näher beleuchtet.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass die spezifische Interaktion von CEACAM3 mit *M. catarrhalis* UspA1 in einer Aktivierung neutrophiler Granulozyten, gekennzeichnet durch Induktion von Degranulation und Produktion reaktiver Sauerstoffspezies, resultiert. Desweiteren kommt es zu einer CEACAM3-UspA1 abhängigen Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B, gefolgt von einer Verstärkung der Sekretion proinflammatorischer Chemokine. Es konnte gezeigt werden, dass die NF- κ B-Aktivierung abhängig von der Phosphorylierung des CEACAM3 ITAM-like Motivs ist und über den Syk und Card9 Signalweg erfolgt.

Die Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass neutrophile Granulozyten in der Lage sind, die durch *M. catarrhalis* induzierte Atemwegsentzündung in der COPD über den Oberflächenrezeptor CEACAM3 spezifisch zu modulieren.

Summary

The chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is the fourth most common cause of death worldwide. 25 % of the acute bacterial exacerbations are caused by infection with the human restricted pathogen *Moraxella catarrhalis*. Both the acute and the chronic inflammatory stage of COPD are predominantly determined by neutrophil granulocytes in the respiratory tract, which in addition to antimicrobial effector functions can also regulate the inflammation or immune response by releasing cytokines. This work investigated if the interaction of *M. catarrhalis* with the human granulocyte-specific receptor carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule (CEACAM) 3 leads to an activation of the neutrophil granulocytes and to a NF-kappaB-dependent chemokine production. Primary granulocytes from healthy donors as well as NB4 cells were infected with *M. catarrhalis* in the presence of various inhibitors, siRNA or CEACAM-blocking antibodies, and then chemokine secretion was determined by ELISA. Using a luciferase reporter gene assay and chromatin immunoprecipitation, activation of the transcription factor NF-kappaB was investigated. In this work it could be shown that the specific interaction of CEACAM3 with *M. catarrhalis* UspA1 results in the activation of neutrophil granulocytes. Furthermore, there is a CEACAM3-UspA1-dependent activation of the transcription factor NF-kappaB and increased secretion of proinflammatory chemokines. NF-kappaB activation is dependent on the phosphorylation of the CEACAM3 ITAM-like motif and occurs via the Syk and Card9 signaling pathways. The results suggest that neutrophil granulocytes are able to specifically modulate *M. catarrhalis* induced airway inflammation in COPD via the surface receptor CEACAM3.

4 Einleitung

4.1 Die chronisch-obstruktive Lungenerkrankung (COPD)

Die chronisch-obstruktive Lungenerkrankung COPD (engl. chronic obstructive pulmonary disease) ist eine weltweit vorkommende, chronisch progressive Erkrankung der Lunge. Sie ist gekennzeichnet durch eine obstruktive Ventilationsstörung, die sich in Kombination mit chronischer Bronchitis und Lungenemphysem in einer messbaren nicht-reversiblen Behinderung der forcierten Ausatmung manifestiert. Laut der Weltgesundheitsorganisation (WHO), sind im Jahr 2012 über 3 Millionen Menschen an COPD verstorben, das entspricht 6 % aller Todesfälle in diesem Jahr weltweit. Dabei finden sich die meisten COPD Toten in Ländern mit mittlerem und geringem Einkommen. Derzeit nimmt die Erkrankung Platz vier auf der Liste der häufigsten Todesursachen weltweit ein, wobei die WHO voraussagt, dass sie bis 2030 auf Platz drei vorge-rückt sein wird (<http://www.who.int/respiratory/copd/en/>).

Da die meisten COPD Patienten Raucher oder Ex-Raucher sind, konnte als Hauptrisikofaktor der inhalative Zigarettenkonsum identifiziert werden. Es wurde gezeigt, dass Tabakrauch direkt die Integrität des Epithels als physikalische Barriere stört, die Permeabilität des Epithels erhöht und die mukoziliäre Reinigung beeinträchtigt. Zusätzlich reagieren die Epithelzellen mit der Freisetzung proinflammatorischer Zytokine, die zur Migration und Aktivierung von Entzündungszellen wie Makrophagen, Neutrophilen und Dendritischen Zellen führen. Die von diesen Zellen produzierten proteolytischen Enzyme und reaktiven Sauerstoffspezies tragen zu einer weiteren Schädigung des Lungengewebes bei (Stampfli and Anderson 2009). Zusätzlich zu der direkten durch Tabakrauch ausgelösten Entzündung, erleichtert die Schädigung des Lungengewebes und die Beeinträchtigung der normalen Lungenabwehr die Besiedelung der unteren Atemwege durch Pathogene.

Neben dem Rauchen können aber auch eine berufsbedingte starke Staub- oder Dampfexposition, die bei der Verbrennung von Biomasse, z. B. beim Kochen oder Heizen, freigesetzten Partikel oder auch das gehäufte Auftreten von respiratorischen Erkrankungen im Kindesalter langfristig zu einer chronischen Atemwegsentzündung führen (Hu, Zhou et al. 2010). In seltenen Fällen entsteht die Erkrankung durch einen genetisch bedingten α 1-Antitrypsinmangel, dabei können Proteasen und Elastasen nicht mehr ausreichend neutralisiert werden, was langfristig zu einer Zerstörung der Alveolarsepten

führt und sich klinisch als Lungenemphysem zeigt (Taraseviciene-Stewart and Voelkel 2008).

Zusätzlich zur chronischen Atemwegsentzündung ist die COPD charakterisiert durch wiederkehrende Episoden mit akuter Verschlechterung der respiratorischen Symptome und massiver Infiltration von neutrophilen Granulozyten. Diese Exazerbationen werden zu rund 70% durch bakterielle oder virale Infektionen ausgelöst und beschleunigen den Krankheitsverlauf der COPD. Dabei nimmt die Häufigkeit der Exazerbationen mit der Schwere der Erkrankung zu (Miravittles and Anzueto 2015). Es zeigte sich, dass oftmals der Erwerb eines neuen, dem Immunsystem bisher unbekannten Bakterienstammes zu einer akuten Exazerbation führt (Sethi and Murphy 2008).

4.1.1 Die chronische Kolonisierung der Atemwege, Mikrobiom

Traditionelle Kultivierungstechniken haben gezeigt, dass Bakterien eine wichtige Rolle in der COPD spielen. Bis vor kurzem ist man, auf Basis dieser Standardtechniken, davon ausgegangen, dass die gesunden unteren Atemwege steril sind. Diese Annahme führte auch dazu, dass bei der im Jahr 2007 begonnenen großangelegten Studie zum humanen Mikrobiom, der Gesamtheit aller Mikroorganismen im menschlichen Körper, der humane Respirationstrakt ausgeklammert wurde. Mittels neuer Sequenzierungstechnologien, dem *next-generation sequencing*, wurde jetzt auch das humane respiratorische Mikrobiom beschrieben. Es zeigte sich, dass die gesunde Lunge nicht steril ist (Dy and Sethi 2016). Im Vergleich zu den oberen Atemwegen, ist das Mikrobiom des unteren Respirationstraktes relativ spärlich. Die derzeitige Theorie ist, dass es, vor allem während des Schlafes, durch Mikroaspiration von Sekreten zu einer vorübergehenden Präsenz mikrobieller Flora aus dem oberen Respirationstrakt kommt. Normale Lungenabwehrmechanismen in gesunden Individuen führen zu einer fortlaufenden Reinigung der unteren Atemwege.

Die bisherigen Analysen des Mikrobioms in der COPD ergaben, dass es innerhalb der verschiedenen Lungenkompartimente variiert. Die Diversität in der Zusammensetzung des Mikrobioms nimmt mit zunehmender Schwere der Erkrankung ab und ist assoziiert mit einer stärkeren Emphysembildung und erhöhter Immunzellinfiltration. Interessanterweise wurde beobachtet, dass die Zunahme eines bekannten Pathogens wie *Häemophilus influenzae* in der Exazerbation ebenfalls zu einer Anreicherung phylogenetisch nahe

liegender Taxa führt, während es zu einem Rückgang phylogenetisch entfernterer Taxa kommt.

4.1.2 „Vicious Circle“ Hypothese der COPD

Anhand der Informationen die über die Auslöser und Pathogenese der COPD bekannt sind, haben Sethi und Murphy 2008 die „Vicious Circle“ Hypothese aufgestellt, welche 2016 noch einmal aktualisiert wurde, siehe Abbildung 1 (Sethi and Murphy 2008, Mammen and Sethi 2016). Sie besagt, dass negative Faktoren wie z.B. Tabakrauch die angeborene Lungenabwehr schädigen. Dies ermöglicht die Persistenz und Proliferation von spezifischen pathogenen Bakterien, die die unteren Atemwege über Mikroaspiration oder Inhalation betreten haben. Über verschiedene Muster-erkennende Rezeptoren auf dem Atemwegsepithel und auf Immunzellen werden die Bakterien erkannt und eine proinflammatorische Immunantwort in Gang gesetzt, die die Infektion beseitigen soll. Diese, in der COPD fehlregulierte, Entzündung führt allerdings zu einer weiteren Schädigung der Lungenabwehrmechanismen, und bietet so Raum für weitere bakterielle Kolonisierung und schließt den Teufelskreis.

Zusätzlich trägt z. B. Tabakrauch zu einer Veränderung der taxonomischen Zusammensetzung und der phylogenetischen Diversität des Lungenmikrobioms bei. Dies führt zu einer fehladaptierten inflammatorischen Antwort, einer weiteren Verschlechterung der Lungenabwehr und weiteren Veränderungen im Lungenmikrobiom, was wiederum den Teufelskreis unterstützt. Akute Änderungen des Atemwegsmikrobioms, z. B. durch den Erwerb eines neuen pathogenen Bakterienstammes, haben verstärkte inflammatorische Immunantworten zur Folge, die sich klinisch als Exazerbation der COPD zeigen.

Somit unterstützt dieser endlose Zyklus von chronischer Infektion und Entzündung das Fortschreiten der Lungenschädigung und stoppt oft auch nach Entfernen des ursprünglichen Auslösers nicht.

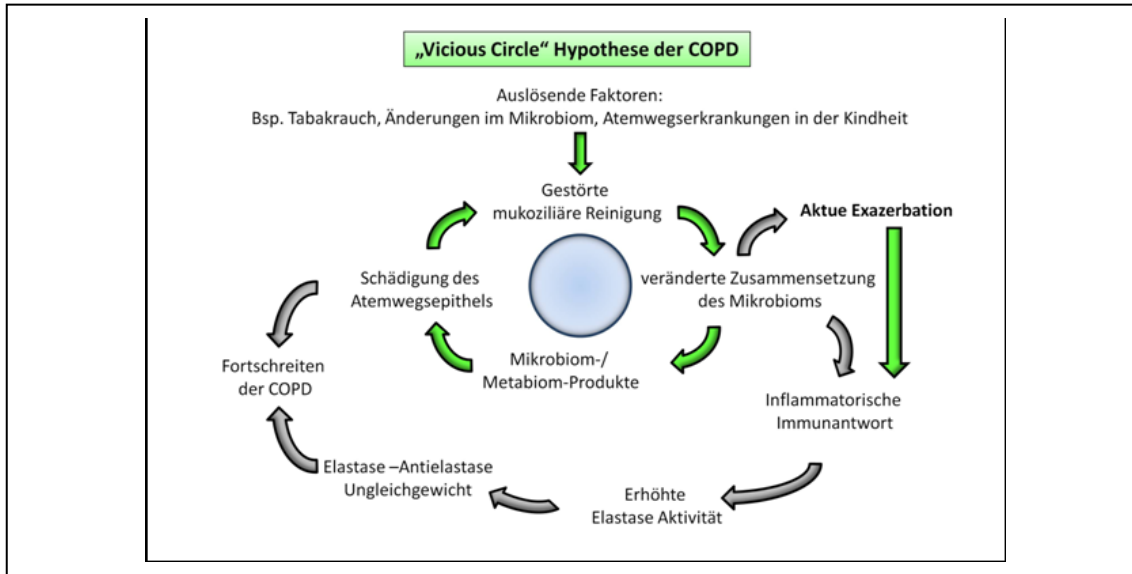


Abb. 1 Die „Vicious Circle“ Hypothese der COPD nach Mammen und Sethi, 2016. Nach der Schädigung der angeborenen Lungenabwehr durch verschiedene auslösende Faktoren, unterstützen Änderungen in der Mikrobiomzusammensetzung einen Kreislauf von Vorkommnissen, die zu weiteren Änderungen des Mikrobioms und einer persistenten Entzündung charakteristisch für die COPD führen (verändert nach (Mammen and Sethi 2016)).

4.2 Humanpathogene Erreger in der COPD

4.2.1 *Moraxella catarrhalis*

Moraxella catarrhalis ist ein ausschließlich humanpathogener Erreger, der ursprünglich vor allem als Auslöser der Otitis media in der Kindheit bekannt war. Während bei Kindern die oberen Atemwege oftmals kolonisiert sind, nimmt die Besiedelung mit zunehmendem Alter ab. Heute ist *M. catarrhalis* auch als pathogener Erreger der unteren Atemwege, vor allem in der COPD, anerkannt. Anfänglich als *Micrococcus catarrhalis* bekannt, wurde das Bakterium aufgrund seiner phänotypischen Ähnlichkeit zu kommensalen *Neisseria*-Arten in *Neisseria catarrhalis* umbenannt. DNA Analysen zeigten dann wenig Homologie zu *Neisseria*, so dass es einer neuen Gattung, *Branhamella*, zugeordnet wurde. Auf der Basis von biochemischen und genetischen Gemeinsamkeiten wurde der Erreger schlussendlich in die Gattung *Moraxella* aufgenommen und erhielt den heutigen Namen *Moraxella catarrhalis* (Murphy and Parameswaran 2009). Morphologisch präsentiert sich *M. catarrhalis* als gram-negativer, unbekapselter Diplokokkus mit abgeflachten Seiten. Allerdings neigt das Bakterium bei der Gram-Färbung zu einer unvollständigen Entfärbung, was die Differenzierung erschweren kann. Die Kolonien auf Blutagarplatten sind nicht-hämolytisch, rund, trüb und

erscheinen hellgrau. Sie lassen sich leicht mit der Impföse verschieben und zeigen nach Abnahme von der Platte eine leichte rosa-orange Färbung. Die Bakterien sind Oxidase-positiv und liefern positive Reaktionen für DNase Produktion, Nitrat-/Nitrit-Reduktion und Tributyrin-Hydrolyse (Verduin, Hol et al. 2002).

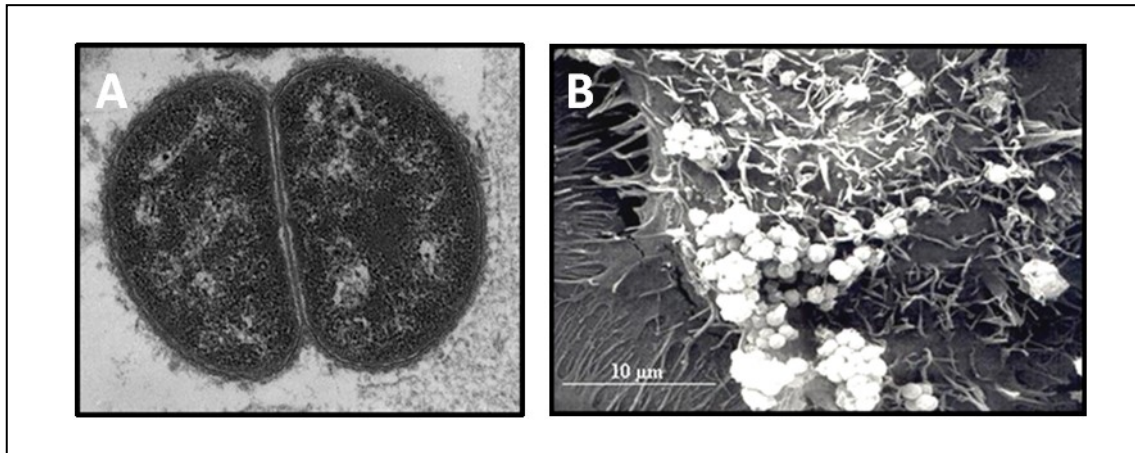


Abb. 2 Elektronenmikroskopische Aufnahmen von *M. catarrhalis* A Transmissionmikroskopie eines Diplokokkus, B Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der Besiedelung humaner Epithelzellen durch *M. catarrhalis* (Slevogt, Seybold et al. 2007)

M. catarrhalis ist in der Lage die Schleimhautoberflächen des Mittelohres in Otitis media Patienten und die unteren Atemwege in COPD Patienten zu besiedeln. Dafür exprimiert das Bakterium spezifische Rezeptoren, die eine Bindung an das Wirtsepithel und Komponenten der Extrazellulären Matrix ermöglichen. Einmal an das Epithel adhärirt, ist es *M. catarrhalis* möglich Mikrokolonien und Biofilme auszubilden (Hall-Stoodley, Costerton et al. 2004, de Vries, Bootsma et al. 2009).

Während lange Distanzen durch Pili überbrückt werden, erfolgt die Interaktion mit dem Epithel über kurze Strecken primär durch verschiedene Proteine in der äußeren Membran (*outer membrane proteins* OMPs). Eine wichtige Rolle spielen dabei die *ubiquitous surface* Proteine A (UspA). Es handelt sich hierbei um multifunktionelle Proteine, die zu der großen Gruppe der trimeren Autotransporter Adhäsine gehören, zu der auch viele andere Virulenzfaktoren diverser pathogener gram-negativer Bakterien, wie das YadA Protein von *Yersinia spec*, gezählt werden (Ackermann, Tiller et al. 2008). Es werden 3 Hauptgruppen unterschieden: UspA1 (88 kDa), UspA2 (62 kDa) und das Hybridprotein UspA2H (92 kDa), wobei die UspA Proteine verschiedener Isolate insbesondere im N-Terminus eine hohe Variabilität aufweisen können. Es ist gezeigt, dass UspA1 die Bindung der Bakterien an verschiedene Epithelzelllinien, wie Chang Bindehautepithelzel-

len, Hep-2 Larynxepithelzellen und A549 Typ II Alveolarepithelzellen, vermittelt. Desweiteren wurde eine Adhäsion an Komponenten der Extrazellulären Matrix wie Fibronektin und Laminin nachgewiesen (Aebi, Lafontaine et al. 1998, Brooks, Sedillo et al. 2008, de Vries, Bootsma et al. 2009). Die Bindungskapazität hängt dabei zum einen von der Isolat-spezifischen UspA1 Variante und der damit verbundenen Bindungsdomäne für die entsprechenden Rezeptoren ab, zum anderen ist die UspA1 Expression selbst phasenabhängig und wird transkriptionell reguliert (Lafontaine, Wagner et al. 2001, Brooks, Sedillo et al. 2008). UspA1 ist neben UspA2H ebenfalls entscheidend für die Ausbildung von Biofilmen (Pearson and Hansen 2007). Zusätzlich sind UspA1 und UspA2 an der Ausbildung der Serumresistenz beteiligt. So wird, unter anderem durch Bindung des Komplementinhibitors C4-bindendes Protein (C4-bp) an der Oberfläche von *M. catarrhalis*, die klassische Komplementaktivierung gehemmt (Nordstrom, Blom et al. 2004). Im Anschluss an die Adhäsion ist *Moraxella* imstande humane Epithelzellen über einen Makropinozytose-artigen Mechanismus zu invadieren. Dabei stellt das intrazelluläre Überleben des Pathogens in vakuolaren Strukturen einen weiteren wichtigen Aspekt bei der Evasion der Wirtsimmunantwort dar (Slevogt, Seybold et al. 2007).

Die Bedeutung von M. catarrhalis in der COPD

Seit den späten 1970iger Jahren ist *M. catarrhalis* auch als ein wichtiges Pathogen des humanen Respirationstrakts bekannt. Hier spielt es als Auslöser von Exazerbationen bei adulten COPD Patienten eine bedeutende Rolle. Es konnte gezeigt werden, dass *M. catarrhalis* als zweithäufigster Erreger für rund 10 %- 15 % aller COPD Exazerbationen verantwortlich ist und zusätzlich die unteren Atemwege in 2,5-10 % der Patienten mit stabiler COPD kolonisiert (Murphy and Parameswaran 2009).

Die Fähigkeit von *M. catarrhalis* im unteren Respirationstrakt zu persistieren wird durch verschiedene Faktoren unterstützt. Zum Einen wird die Adhäsion der Bakterien durch die bei Rauchern und COPD-Patienten gestörte mukoziliäre Reinigung und Störung der Epithelbarriere erleichtert (Stampfli and Anderson 2009). Zum Anderen spielen verschiedene Immunevasionsmechanismen, wie Hemmung der Komplementaktivierung oder Phasenvariation der Virulenzfaktoren eine bedeutende Rolle.

Die Kolonisierung der unteren Atemwege führt zu einer persistenten Exposition mit *M. catarrhalis* und bakteriellen Produkten, was eine chronische Entzündung und die daraus resultierende Obstruktion der Atemwege zur Folge hat. *Moraxella* induziert in Lungenepithelzellen die Produktion proinflammatorischer Zytokine wie z. B. CXCL8, IL-6 oder Tumornekrosefaktor alpha (TNF- α), die zu einer Aktivierung der angeborenen und adaptiven Immunantwort führen (Parameswaran, Wrona et al. 2009, N'Guessan, Haarmann et al. 2014). Insbesondere die Aktivierung von neutrophilen Granulozyten spielt eine wichtige Rolle bei der entzündungsbedingten Schädigung des Lungengewebes in COPD Patienten (Eldika and Sethi 2006). Während die Kolonisierung mit *M. catarrhalis* mit einem signifikanten Anstieg des CXCL8 und TNF- α Levels im Sputum von COPD Patienten verbunden ist, wird bei einer akuten *Moraxella*-induzierten Exazerbation ein noch stärkerer Anstieg der Atemwegsentzündung verzeichnet. Es wird davon ausgegangen, dass insbesondere der Erwerb eines neuen *M. catarrhalis* Stammes zu einer Verstärkung der Atemwegsentzündung in der COPD führt. Wahrscheinlich ist dies durch eine stärkere Vermehrung des neu erworbenen Stammes, aufgrund einer fehlenden spezifischen Immunantwort, bedingt. Zusätzlich konnte in der Exazerbation im Sputum ein Protease-Anti-Protease Ungleichgewicht festgestellt werden. Der Neutrophile Elastase-Spiegel steigt an, während das Level der Antiprotease SLPI absinkt (Parameswaran, Wrona et al. 2009). Somit lässt sich sagen, dass sowohl die pathologische Kolonisierung der unteren Atemwege als auch eine akute Infektion mit *M. catarrhalis* durch die Induktion einer proinflammatorischen Immunantwort einen entscheidenden Beitrag zum Fortschreiten der Lungengewebsschädigung im Verlauf der COPD leistet.

4.3 Mechanismen der angeborenen Immunabwehr

Aufgrund der stetigen Konfrontation mit eindringenden Mikroorganismen entwickelte sich im Laufe der Evolution ein zweiarmliges Abwehrsystem, das in der Lage ist infektiöse Pathogene aus dem Körper zu eliminieren. Die angeborene Immunität ist die erste Verteidigungslinie gegen Pathogene und wird u.a. durch Phagozyten, wie Neutrophile, Makrophagen und Dendritische Zellen, vermittelt. Die erworbene Immunität ist an der Eliminierung der Pathogene in der späten Infektionsphase und an der Entstehung eines immunologischen Gedächtnisses beteiligt. Im Gegensatz zu der sehr spezifischen er-

worbenen Immunität, ist die angeborene Immunantwort zumindest in der Lage zwischen eigenen Zellen und einer Vielzahl von Pathogenen zu unterscheiden. Dabei erfolgt die Erkennung der Mikroorganismen über eine begrenzte Anzahl Keimbahnkodierter Muster-erkennender Rezeptoren (*pattern recognition receptors* PRRs) (Akira, Uematsu et al. 2006).

4.3.1 Effektorzellen

4.3.1.1 Bronchialepithelzellen

Für die angeborene Immunantwort der Lunge ist das Bronchialepithel als Grenzfläche zwischen dem inneren Milieu und der Umwelt von entscheidender Bedeutung. Hier findet der erste Kontakt zwischen eindringenden pathogenen Mikroorganismen und dem Wirt statt. Verschiedene Mechanismen haben sich im Laufe der Evolution entwickelt, um die Lunge vor Infektion und Schädigung zu schützen (Abb. 3). Zum einen bildet das Epithel als kontinuierlicher, über *tight junctions* verankerter Zellverband eine mechanische Barriere. Zum anderen ermöglichen Zilien-tragende Zellen und die Mukusproduzierenden Becherzellen den Abtransport von Mikroorganismen und anderen Partikeln, die sogenannte mukoziliäre Reinigung. Mit koordinierter Zilienbewegung wird der Mukus inklusive der Fremdpartikel in Richtung Gastrointestinaltrakt transportiert. In der COPD kommt es oftmals zu einer exzessiven Becherzelldifferenzierung gefolgt von einer Mukusüberproduktion, während sowohl die Anzahl der Zilien-tragenden Zellen vermindert als auch die Funktionsfähigkeit der Zilien eingeschränkt sind (Whitsett and Alenghat 2015).

Ein weiterer wichtiger Mechanismus ist die Produktion einer grenzflächenaktiven Substanz, Surfactant genannt, durch Typ II Alveolarepithelzellen. Das pulmonare Surfactant besteht hauptsächlich aus Lipiden und niedrig konzentrierten Surfactant Proteinen (SP) und ist entscheidend um die Oberflächenspannung in den Alveolen während der Atmungs-bedingten dynamischen Änderung des Lungenvolumens zu vermindern. Die Surfactant Proteine SP-A und SP-D sind in der Lage diverse Pathogen-assoziierte molekulare Muster (*pathogen-associated molecule patterns* PAMPs) zu binden und so die Opsonierung und Vernichtung der Pathogene durch Alveolarmakrophagen zu verstärken und die Aktivität von Makrophagen, Neutrophilen und Lymphozyten zu regulieren (Whitsett, Wert et al. 2010, Ariki, Nishitani et al. 2012).

Neben dem vielschichtigen unspezifischen Abwehrsystem durch mukoziliäre Reinigung und Surfactant sind Epithelzellen in der Lage mikrobielle Pathogene und ihre Produkte durch PRRs wie Toll-like Rezeptoren und Nod-like Rezeptoren zu erfassen und eine Signalkaskade zur Rekrutierung und Instruktion von Immunzellen in Gang zu setzen (Whitsett and Alenghat 2015).

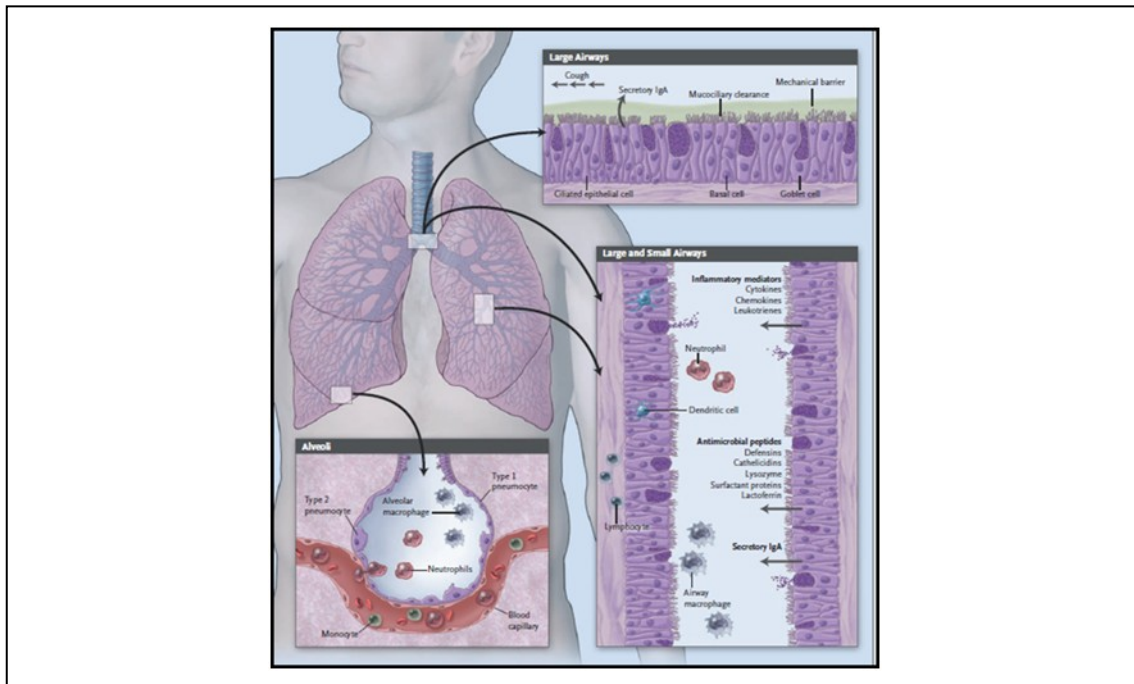


Abb.3 Überblick über die angeborenen Abwehrmechanismen in den humanen Atemwegen Zellen die an der angeborenen Immunität beteiligt sind: Zilientragende Epithelzellen, Becherzellen, Dendritische Zellen, Makrophagen, Neutrophile und Pneumozyten. Sekretierte Produkte, die zur angeborenen Immunität beitragen: antimikrobielle Peptide, Entzündungsmediatoren, Mucin, sekretorisches IgA (aus (Sethi and Murphy 2008))

4.3.1.2 neutrophile Granulozyten

Neutrophile Granulozyten sind die in größter Zahl vorkommenden weißen Blutzellen im menschlichen Organismus. Neben Alveolarmakrophagen sind sie die ersten Immunzellen am Ort der Infektion und spielen eine entscheidende Rolle in der Immunabwehr gegen pathogene Bakterien und Pilze. Zusätzlich sind sie an der Ausbildung inflammatorischer Reaktionen beteiligt. Obwohl sie primär eine positive Rolle in der Bekämpfung von Infektionen spielen, kann ihre übermäßige unkontrollierte Aktivierung zu Gewebeschädigung oder überschießenden Entzündungsreaktionen führen (Mocsai 2013).

Die neutrophilen Granulozyten sind ausdifferenzierte Zellen, die im Knochenmark gebildet werden und während ihrer Reifung verschiedene intrazelluläre Kompartimente ausbilden. In diesen sekretorischen Granula und Vesikeln werden Proteine gelagert, die für die antimikrobielle und proinflammatorische Funktion der Zellen von Bedeutung sind (Borregaard 2010). Nach der Freisetzung aus dem Knochenmark zirkulieren die Neutrophilen im Blut auf der Suche nach Chemokinen als Anzeichen einer Infektion oder Entzündung. Entlang von Chemokingradienten migrieren die Zellen durch die Gefäßwand in das Gewebe zum Ort der mikrobiellen Invasion. Die infektiösen Partikel werden phagozytiert und durch Freisetzung schädlicher Substanzen in die Phagosomen, wie reaktive Sauerstoffspezies und dem Inhalt der intrazellulären Granula, eliminiert (Mocsai 2013). Neben der Phagozytose sind neutrophile Granulozyten in der Lage durch einen Netosis genannten Prozess, den Inhalt ihres Nukleus inklusive DNA zusammen mit Granula-Proteinen in den extrazellulären Raum abzugeben und so Phagozytose-unabhängig Bakterien und Pilze abzuwehren (Brinkmann and Zychlinsky 2012, Parker, Albrecht et al. 2012). Zusätzlich ist bekannt, dass aktivierte Neutrophile verschiedene Zytokine und Chemokine freisetzen und somit zur Steuerung der inflammatorischen Immunantwort beitragen (Cassatella 1995) (Abb.4).

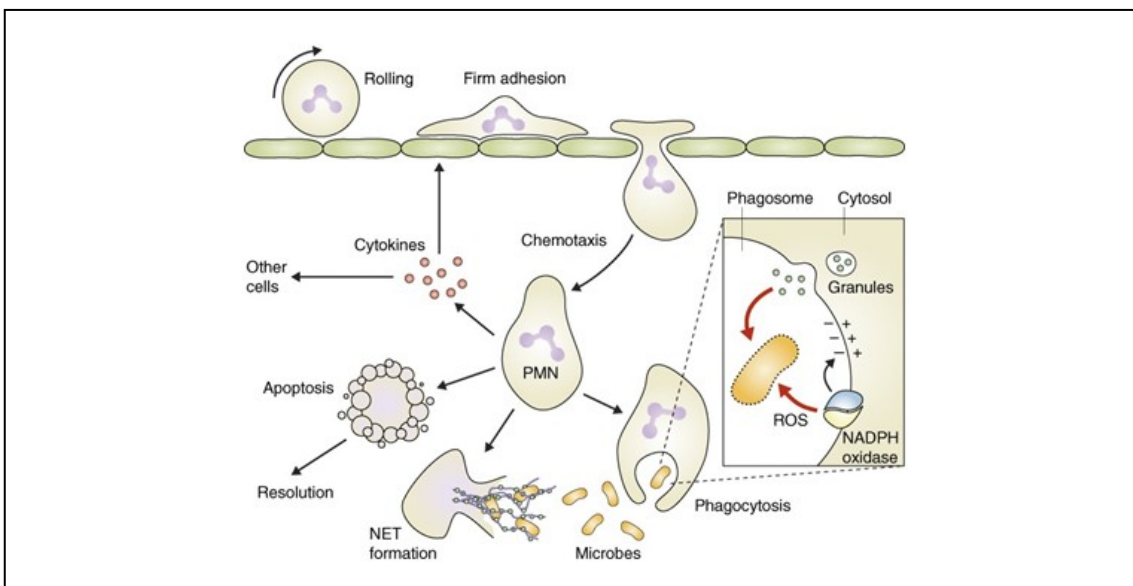


Abb.4 Funktionen neutrophiler Granulozyten. Nach Migration an den Ort der Entzündung werden durch Neutrophile eingedrungene Mikroorganismen phagozytiert und verdaut; NETs freigesetzt, welche in der Lage sind Mikroorganismen extrazellulär zu bekämpfen und proinflammatorische Zytokine ausgeschüttet (aus (Mocsai 2013)).

Aufgrund ihrer kurzen Lebensspanne und primären Rolle bei der Lokalisation und Eliminierung von eindringenden Mikroorganismen, wurden Neutrophile in der Vergan-

genheit als einfache Suizid-begehende Killerzellen angesehen. Erst in den letzten Jahrzehnten hat sich gezeigt, wie vielfältig ihre Aufgaben bei der angeborenen antimikrobiellen Abwehr und als Effektorzellen der erworbenen Immunabwehr sind. Inzwischen ist bekannt, dass sie auch an der Abwehr intrazellulärer Pathogene wie Viren und Mykobakterien beteiligt sind. Desweiteren sind sie in der Lage die adaptive Immunantwort u.a. über die Regulation von B-Zellen, T-Zellpopulationen, Dendritischen Zellen mit zu formen (Mocsai 2013).

Die Bedeutung der Granulozyten in der COPD

Verschiedene Studien zeigen ein verstärktes Auftreten von Neutrophilen im Sputum und in Broncholavage (BAL)-Proben in Verbindung mit bakterieller Besiedelung in COPD Patienten. Zusätzlich konnten erhöhte Level von TNF-alpha, CXCL8, Neutrophile Elastase (NE) und der Matrix Metalloproteinase 9 (MMP9) nachgewiesen werden (Soler, Ewig et al. 1999, Sethi, Maloney et al. 2006). CXCL8 und Neutrophile spielen eine Schlüsselrolle in der Pathogenese der COPD, da die CXCL8 Produktion und auch die Neutrophilie sowohl mit der Entstehung von Emphysemen in asymptomatischen Rauchern als auch mit einer verstärkten Sputumproduktion und einer erhöhten Atemwegsobstruktion einhergeht (Sethi and Murphy 2008). Patienten mit einer schweren COPD im stabilen Stadium haben nachweislich eine hohe Anzahl an Neutrophilen in den Atemwegen, diese Anzahl erhöht sich nochmals signifikant während der Exazerbation, vermutlich durch die verstärkte Ausschüttung von Chemokinen sowohl durch die Neutrophilen vor Ort, als auch durch das Bronchialepithel. Die von den Granulozyten freigesetzten proteolytischen Substanzen, wie Neutrophile Elastase, führen nicht nur zur Eliminierung der Pathogene sondern fördern das Fortschreiten der COPD durch Zerstörung des Lungengewebes. Unterstützt wird dieser degenerative Prozess durch die, in der COPD beobachtete, anormale erhöhte Motilität und Überlebensfähigkeit der Neutrophilen, verbunden mit einer geringeren Zielgenauigkeit, was zu einer noch umfangreicheren Zerstörung des Wirtsgewebes während der Migration führt (Holloway and Donnelly 2013).

4.3.2 Rezeptoren der angeborenen Immunantwort

4.3.2.1 Muster-erkennende Rezeptoren (PRRs)

PRRs sind Keimbahn-kodierte, nicht-klonale, vom immunologischen Gedächtnis unabhängige, konstitutiv exprimierte Rezeptoren, die in der Lage sind mikrobielle Komponenten, sogenannte PAMPs, zu erkennen, welche für das Überleben des Mikroorganismus essentiell und somit schwer zu verändern sind. Dabei reagieren verschiedene PRRs mit spezifischen PAMPs, aktivieren spezifische Signalwege und führen somit zu einer individuellen antipathogenen Immunantwort (Akira, Uematsu et al. 2006).

Die wohl bekanntesten und am besten untersuchte Gruppe der PRRs sind die Toll-like Rezeptoren (TLRs). In Säugetieren sind 12 TLRs beschrieben, die anhand ihrer Primärsequenz verschiedenen Untergruppen zugeordnet werden können. Zum Beispiel erkennt die Unterfamilie aus TLR1, TLR2 und TLR6 Lipide, während TLR7, TLR8 und TLR 9 Nukleinsäuren erfassen. Interessanterweise gibt es aber auch Vertreter, die in der Lage sind strukturell völlig verschiedene Liganden zu binden. So erkennt TLR4 Lipopolysaccharid, das pflanzliche Diterpen Paclitaxel, Fibronectin und Hitzeschockproteine. TLRs werden von einer Vielzahl von Immunzellen, inklusive Makrophagen, Granulozyten und Dendritischen Zellen, B Zellen, spezifischen T Zellen und auch anderen Zellen, wie Fibroblasten und Epithelzellen, exprimiert. Oftmals erfolgt eine Modulation der Expression als schnelle Antwort auf ein Pathogen, verschiedene Zytokine oder Umweltstress. Während TLR1, 2, 4, 5 und 6 auf der Zelloberfläche zu finden sind, wurden TLR3, 7, 8 und 9 beinahe ausschließlich in intrazellulären Kompartimenten wie Endosomen nachgewiesen. Die Stimulation von Zellen mit einem TLR Liganden, führt zu einer Rekrutierung von Adapter Proteinen mit einer TIR Domäne, wie dem *myeloid differentiation factor* 88 (Myd88). Dadurch werden Signalkaskaden in Gang gesetzt, die in einer Produktion proinflammatorischer Zytokine und Chemokine enden und somit zur angeborenen Immunabwehr beitragen (Akira, Uematsu et al. 2006).

4.3.2.2 *Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecules* (CEACAMs)

Die Rezeptoren aus der Familie der *carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecules* (CEACAMs) sind Immunglobulin-verwandte Glykoproteine, die in der Regel aus einer Ig_V-artigen hochkonservierten N-Domäne und variablen Ig_{C2}-artigen Domänen

stabilisiert durch Disulfidbrücken bestehen. Die membrangebundenen Vertreter sind entweder über eine Glycosyl-Phosphatidyl-Inositol (GPI) – Gruppe verankert oder liegen transmembranär mit verschiedenen zytoplasmatischen Domänen vor.

Die Gruppe der humanen CEACAMs besteht aus 12 Mitgliedern, die zelltypisch exprimiert werden. Sie sind an der Modulation genereller zellulärer Prozesse, wie Zelladhäsion, Differenzierung und Proliferation, beteiligt und können auch als immunmodulatorische Mediatoren agieren. Zudem wurden einige CEACAMs aufgrund ihrer erhöhten Expression in malignem Gewebe und erhöhtem Serumlevel als verwertbare Tumormarker erkannt (Gebauer, Wicklein et al. 2014). Interessanterweise interagieren einzelne humane CEACAMs mit Bakterien wie *Neisseria gonorrhoeae*, *Hämophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, *Escherichia coli* und *Helicobacter pylori* und tragen damit zur bakteriellen Adhäsion an die Zelle bei (Javaheri, Kruse et al. 2016).

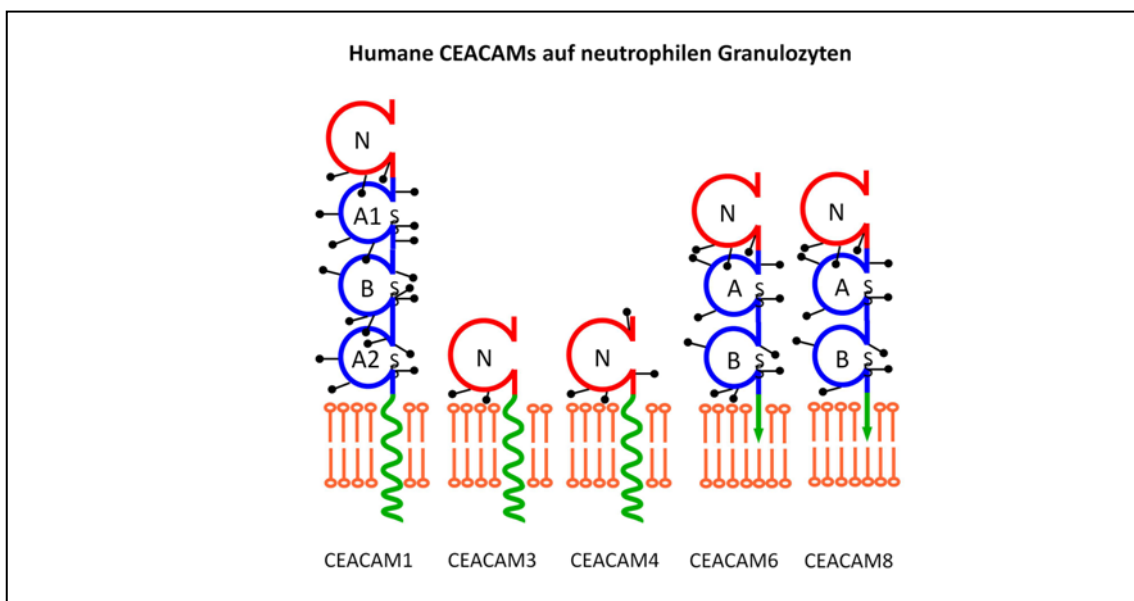


Abb.5 Humane CEACAMs exprimiert auf neutrophilen Granulozyten. CEACAM Proteine bestehen aus einer hochkonservierten N-terminalen Ig_V-artigen Domäne (rot), variablen Ig_{C2}-homologen Domänen (blau) vom Typ A oder B und sind entweder transmembranär (grüne Schlangenlinie) angelegt oder über einen Glykosyl-Phosphatidylinositol (GPI-)Anker (grüner Pfeil) mit der Oberfläche verbunden (angepasste Abbildung von <http://www.carcinoembryonic-antigen.de>).

Humane Granulozyten exprimieren CEACAM1, 3, 4 und die GPI-verankerten Rezeptoren CEACAM6 und 8, siehe Abbildung 5 (Chen and Gotschlich 1996, Singer, Scheffrahn et al. 2002, Delgado Tascon, Adrian et al. 2015). Für CEACAM1 ist auf humanem Lungenepithel bekannt, dass die Interaktion mit dem *M. catarrhalis* UspA1

die TLR2-vermittelte Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B inhibiert, was dem Erreger ermöglicht der inflammatorischen Immunantwort zu entgehen. Das *immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif* (ITIM) in der zytoplasmatischen Domäne von CEACAM1 ist dabei von entscheidender Bedeutung (Slevogt, Zabel et al. 2008).

Im Gegensatz dazu besitzt CEACAM3, welches ausschließlich auf humanen Granulozyten exprimiert wird, eine *immunoreceptor tyrosine-based activation motif* (ITAM)-ähnliche Sequenz in seiner zytoplasmatischen Domäne. Dieses ITAM-ähnliche Motiv (YxxLx₍₇₎YxxM) unterscheidet sich vom konventionellen ITAM (YxxL/Ix₍₆₋₁₂₎YxxL/I) durch die Sequenz um das, von der Membran am weitesten entfernte, Tyrosin, was seine Funktionsfähigkeit nicht einschränkt (Chen and Gotschlich 1996, Schmitter, Agerer et al. 2004, Buntru, Roth et al. 2012, Sarantis and Gray-Owen 2012). Die spezifische Bindung von *Neisseria* an CEACAM3 resultiert in der Opsonin-unabhängigen Phagozytose des Erregers und löst neutrophile antibakterielle Abwehrmechanismen, wie die Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies und Degranulation, aus (Sarantis and Gray-Owen 2012, Sintsova, Sarantis et al. 2014). *M. catarrhalis* wird ebenfalls von humanen Granulozyten CEACAM3-abhängig phagozytiert (Schmitter, Agerer et al. 2004, Buntru, Roth et al. 2012).

Im Gegensatz zu CEACAM3, wo keine homo- oder heterophilen Interaktionen mit anderen CEACAMs bekannt sind, konnte für das ebenfalls ausschließlich auf Granulozyten exprimierte CEACAM8 eine Interaktion mit CEACAM1 nachgewiesen werden, die zu einer Inhibition der TLR2-induzierten Immunantwort in Lungenepithelzellen führt. Dabei wird bakterielle DNA über TLR9 erkannt und daraufhin CEACAM8 von den Granulozyten freigesetzt. Ein interessanter Mechanismus, über den Granulozyten in der Lage sind die proinflammatorische Immunantwort in der humanen Lunge zu reduzieren (Singer, Opp et al. 2014).

4.3.2.3 Andere ITAM-tragende Rezeptoren

Eine Vielzahl von Membranrezeptoren, wie z.B. der T-Zell- und der B-Zellrezeptor, der Fc-gamma Rezeptor IIb (Fc γ RIIb) und Interleukinrezeptoren, weisen in ihrer zytoplasmatischen Domäne ITIMs und ITAMs auf. Die Phosphorylierung der ITIM/ITAM Domänen resultiert in der Rekrutierung von Proteinkinasen oder Phosphat-

asen, was letztlich zu einer Stimulation oder Terminierung von u.a. Zellproliferations-regulierenden Signalwegen führt).

Dectin-1, ein Transmembranrezeptor aus der Familie der C-Typ Lektine, besitzt ebenfalls ein zytoplasmatisches hem-ITAM, auch ITAM-artige Signaldomäne genannt. Es handelt sich um einen nicht zu den TLRs gehörenden PRR, der auf myeloiden Zellen, sowie Lungenepithelzellen exprimiert wird und besonders bei der Erkennung des β -Glukans aus der Zellwand von Pilzen eine Rolle spielt (Brown 2006). Zusätzlich ist er an der Immunantwort gegen *Hämophilus influenzae* beteiligt (Heyl, Klassert et al. 2014).

Die Stimulation von Dectin-1 führt über eine hem-ITAM-vermittelte Signalkaskade zu Phagozytose, der Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies und der Freisetzung proinflammatorischer Chemokine und Zytokine. Die Ligandenbindung führt dabei u.a. zur Aktivierung von NF- κ B über die Rekrutierung der Syk Kinase und den Card9/Bcl10/Malt1 Weg (Gross, Gewies et al. 2006). Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass Dectin-1 zusätzlich in der Lage ist mit TLRs zu kollaborieren und so die proinflammatorische Immunantwort noch weiter steigert (Gantner, Simmons et al. 2003).

5 Ziele der Arbeit

In der Pathogenese der COPD spielt die pathologische Kolonisierung, sowie die akute Infektion der unteren Atemwege mit *M. catarrhalis* durch die Induktion einer proinflammatorischen Immunantwort eine wichtige Rolle. Gleichzeitig kommt es während der stabilen COPD und besonders auch in der Exazerbation zu einer verstärkten Migration von neutrophilen Granulozyten. Während über die Auswirkungen einer *M. catarrhalis* Infektion auf das humane Lungenepithel einiges bekannt ist, ist die Interaktion zwischen *M. catarrhalis* und neutrophilen Granulozyten bisher noch unzureichend untersucht.

Deshalb soll die Hypothese geprüft werden, dass die Bindung von *Moraxella catarrhalis* an den Rezeptor CEACAM3 zu einer spezifischen Aktivierung humaner Granulozyten führt. Folgende Fragen sollen dabei adressiert werden:

1. Führt die Interaktion von *M. catarrhalis* mit humanen Granulozyten zu einer zellulären Aktivierung der Granulozyten?
2. Führt der zugrundeliegende Signalweg über die Rekrutierung der Syk Kinase und das Card9 Signalosom?
3. Wird über diesen CEACAM3-Syk-Card9 Signalweg eine NF- κ B vermittelte Zytokinsekretion induziert?

Insgesamt soll diese Arbeit zum besseren Verständnis der Zusammenhänge, vor allem hinsichtlich der Wechselwirkungen zwischen Erregern und Immunzellen, bei der Induktion der proinflammatorischen Immunantwort in der COPD beitragen.

6 Methodik

6.1 Material

Alle in diesem Kapitel nicht aufgeführten Chemikalien werden in Laboratorien standardmäßig eingesetzt und entsprechen den analytischen Reinheitsgraden.

6.1.1 Zelllinien und Bakterienstämme

6.1.1.1 Zelllinien

Humane promyelozytische Zelllinie NB4

Die Zelllinie NB4 wurde 1989 aus dem Knochenmark einer 23 Jahre alten Frau mit Akuter Promyelozytischer Leukämie isoliert. Die in dieser Arbeit verwendeten Zellen wurden von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) bezogen (Nummer ACC207).

Humane embryonale Nierenepithelzelllinie HEK293

Bei den HEK293 Zellen handelt es sich um eine permanente Linie primärer humaner embryonaler Nierenzellen, die durch Transfektion mit Adenovirus Typ 5 DNA immortalisiert wurden. Die in dieser Arbeit verwendeten Zellen wurden bei der DSMZ bezogen (Nummer ACC305).

Humane Cervixkarzinom Zelllinie HeLa

Die stabil CEACAM3-transfizierten, sowie die Leervektor-transfizierten HeLa Zellen wurden freundlicherweise von Bernhard B. Singer (Universität Duisburg-Essen) zur Verfügung gestellt.

6.1.1.2 Bakterienstämme

Moraxella catarrhalis

Das europäische *Moraxella catarrhalis* – Isolat BBH18 sowie die UspA1 Deletionsmutante BBH18.1 stammen freundlicherweise von Kristian Riesbeck (Lund University, Lund, Schweden).

6.1.2 Substanzen, Lösungen und Kits

Tab. 1 verwendete Substanzen, Lösungen, Kits

Bezeichnung	Verwendung	Hersteller
1 Step Polymorph	Zellseparationsmedium	Accurate Chemical & Scientific Corporation
100 bp Ladder, Längenstandard	Agarosegelelektrophorese	New England Biolabs
2 x SensiFAST™ SYBR® No-ROX Kit	qPCR	Bioline GmbH
2',7'Dihydrodichlorofluorescein diacetate (DHCF-DA)	Nachweis reaktiver Sauerstoffspezies	Sigma Aldrich GmbH
Agarose	Agarosegelelektrophorese	Sigma Aldrich GmbH
All trans Retinolsäure (ATRA)	NB4 Differenzierung	Sigma
Ammoniumpersulfat 10%ig	Westernblotgel	Roth
Bis-Acrylamid 40%ig (w/v)	Westernblotgel	Serva
Borsäure	Agarosegelelektrophorese	Carl Roth GmbH
Bradford Reagenz 5x	Westernblot	Serva
Bromphenolblau 1%ig	Westernblot	Sigma
Chloramphenicol	Selektionsantibiotikum für Bakterienkultur (Einsatz: 1,5 µg/ml)	Roth GmbH
Columbia Agar Platten mit 5% Schafsblut	Festmedium für Moraxellenanzucht	BD Diagnostic Systems
Cruz Marker™ Molecular Weight Standards	Westernblot	Santa Cruz
Cytofix/Cytoperm (1x) Solution	Durchflusszytomtrie	BD Pharmingen
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Kryokonservierung Zellkultur	Roth
DNaseI	Abbau von genomischer DNA	Qiagen
dNTP Mix	RT-PCR	Promega Corporation
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Zellkulturmedium Granulozyten und HEK Zellen	Gibco® Life Technologies Corporation
Dulbecco's PBS (1 x)	Durchflusszytomtrie, ELISA	PAA
ECL (enhanced chemiluminescence)	Westernblot	ThermoScientific
EDTA	Agarosegelelektrophorese	Sigma Aldrich GmbH
Entwicklerlösung	Westernblot	Agfa
Essigsäure 100%ig	Westernblot	Merck
Ethidiumbromid-Lösung (10 mg/ml)	Agarosegelelektrophorese	Sigma Aldrich GmbH
FACS Clean	Durchflusszytomtrie	BD Pharmingen
FACS Flow	Durchflusszytomtrie	BD Pharmingen
FACS Rinse	Durchflusszytomtrie	BD Pharmingen

Bezeichnung	Verwendung	Hersteller
FBS	Durchflusszytomtrie, ELISA	Gibco
FBS (Fetales Kälberserum)	Zellkultur, ELISA, Durchflusszytometrie	Biochrom AG
Fixierlösung	Westernblot	Agfa
Formaldehyd (35 %)	Durchflusszytometrie	Carl Roth GmbH
G418	Selektionsantibiotikum für stabil transfizierte HeLa Zellen Einsatz: 1mg/ml	Invivogen
GelRed Nucleic Acid Gel Stain, 10,000X in water	Agarosegelelektrophorese	Biotium, Inc.
GeneCellin Transfektion Reagent	Transfektion von HEK293 Zellen	BioCellChallenge
Glycerin	Westernblot	Roth
Glycin	ChIP	Sigma Aldrich GmbH
Glyzerol 99,5 % ig	Kryokonsevirung	Fluka Biochemika
H ₂ SO ₄ (95-97 %ig)	ELISA, MPO Messung	Merck
High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	RT-PCR	Applied Biosystems® life technologies
Hirn-Herz-Aufguss - Pulver (BHI, Brain Heart Infusion)	Flüssigmedium für Moraxellen (Einsatz 37g/l)*	BD Diagnostic Systems
Human CCL3 (MIP-1 alpha) ELISA Ready-SET-Go	ELISA	ebioscience, Inc.
Human IL-8 ELISA Set	ELISA	BD Biosciences
InnuPREP RNA Mini	RNA-Isolation	Analytik Jena
Lonza Nucleofector Kit Sol. V	Transfektion von NB4 Zellen	Lonza
Luciferase Reporter Gene Assay, high sensitivity	Luciferase-Reporter-Assay: Messung der NF-κB-Aktivierung	Roche Applied Science
Methanol	Westernblot	Merck
Milchpulver	Westernblot	Fluka Biochemika
Natriumcarbonat (Na ₂ CO ₃)	ELISA	Merck
Natriumchlorid	ChIP	Carl Roth GmbH
Natrium-Desoxycholat	ChIP, Koimmunpräzipitation	Fluka Biochemika
Natriumfluorid 99%ig, 1M	Westernblot	Serva
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	ELISA	Merck
Natriumorthovanadat 98%ig, 200mM	Westernblot	Sigma
Natriumpyrophosphat, 150mM	Westernblot	Fluka Biochemika
Nonidet P-40	ChIP	Fluka Biochemika
Nonidet® P-40 20%ig	Westernblot	Fluka Biochemika
Perfect-LoadDye Konzentrat (10x)	RT-PCR	5-Prime GmbH

Bezeichnung	Verwendung	Hersteller
Perfect-LoadDye Konzentrat (10x)	RT-PCR	5-Prime GmbH
PerfectTaq Plus DNA Polymerase	RT-PCR	5-Prime GmbH
PerfectTaq Plus DNA Polymerase	RT-PCR	5-Prime GmbH
PerfectTaq Plus PCR Puffer (10x)	RT-PCR	5-Prime GmbH
PerfectTaq Plus PCR Puffer (10x)	RT-PCR	5-Prime GmbH
Perm-wash (10x) Solution	Durchflusszytometrie	BD Pharmingen
Pervanadat	0,1%	
Phosstop	Koimmunpräzipitation	Roche
Ponceau S	Westernblot	Sigma
Primer rückwärts (10 µM)	RT-PCR, qPCR	Eurofins
Primer vorwärts (10 µM)	RT-PCR, qPCR	Eurofins
Protein A- und G-Sepharose	ChIP, Koimmunpräzipitation, Pull-Down Assay	GE Healthcare
Protein Kaleidoscope	Westernblot	BioRad
Proteinase K 600 mAU/ml	ChIP	Novagen® Merck KGaA
Proteinase-Inhibitor Cocktail Set I (100x)	ChIP, Westernblot	Calbiochem
Renilla Luciferase Assay System	Luciferase-Reporter-Assay: Messung der Aktivität der <i>Renilla</i> -Luciferase	Promega Corporation
Ribonuclease A from bovine pancreas	ChIP	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
RNase- und DNase- freies A.dest.	Verdünnung PCR	Ambion GmbH, life technologies
RNeasy mini kit	RNA-Isolation	Qiagen
RPMI	Zellkulturmedium NB4 Zellen	Gibco® Life Technologies Corporation
SDS 10%ig	ChIP	Carl Roth GmbH
β-Mercaptoethanol 1%ig	Westernblot	Roth
TEMED	Westernblotgel	Serva
TE-Puffer, DNase/RNase-frei	Verdünnung der cDNA	Sigma Aldrich GmbH
TMB ELISA Substrate Solution	ELISA, MPO Aktivitätsmessung	ebioscience, Inc.
TRIS	Agarosegelelektrophorese	Carl Roth GmbH
Tris pH 7,5	ChIP	Carl Roth GmbH
Tris-Base	Westernblot	Roth
Triton X-100	Koimmunpräzipitation	Fluka Biochemika
Trypanblau	Lebendzellzahlbestimmung	Invitrogen™ Life Technologies Corporation
Trypsin/EDTA 1 x	Ablösen adhärenter Zellen	Gibco
Tween20	Durchflusszytometrie, ELISA	Sigma Aldrich

Tab. 2 Stimulanzen und Inhibitoren

	Eingesetzte Konzentration	Spezifität	Hersteller
Stimulanzen			
Pam3Cys-KKK	1 µg/ml	TLR 2/1 Agonist	Enzo
Inhibitoren, blockende Antikörper			
R406	1 µM, 1 h	Syk-Kinase	InvivoGen
Maus anti-humanes CEACAM1 Antikörper [#18/20]	30 µg/ml, 1 h	CEACAM1	Bernhard B. Singer, Essen
Maus anti-humanes CEA Antikörper [Col-1]	30µg/ml, 1h	CEACAM3, CEACAM5	Abcam, Santa Cruz
Maus anti-humanes CEACAM6 Antikörper [1H7-4B]	30µg/ml, 1h	CEACAM6	Bernhard B. Singer, Essen

6.1.3 Antikörper, Plasmide, Primer, siRNA

Tab. 3 Primäre Antikörper

Antikörper	Verwendung	Hersteller
Kaninchen-anti-NF-κB p65 (C-20)	Chromatin-Immunpräzipitation, 2µg/Probe	Santa Cruz Biotechnology, Inc.
Kaninchen-anti-cRel (C) X	Chromatin-Immunpräzipitation, 2µg/Probe	Santa Cruz Biotechnology, Inc.
Kaninchen-anti-Polymerase II (N-20) X	Chromatin-Immunpräzipitation, 2µg/Probe	Santa Cruz Biotechnology, Inc.
Maus-anti-Syk (4D10.1)	WB	Millipore
Kaninchen-anti-Syk (N19)	FACS	Santa Cruz Biotechnology, Inc.
Kaninchen-anti-pSyk (Tyr323)	FACS	Santa Cruz Biotechnology, Inc.
Maus-anti-CEACAM1 (#18/20)	FACS, Blocken von CEACAM1	Bernhard B. Singer, Essen
Maus anti-CEA (Col-1)	FACS, Blocken von CEACAM3	Abcam, Santa Cruz Biotechnology, Inc.
Maus anti-CEACAM6 (1H7-4B)	FACS, Blocken von CEACAM6	Bernhard B. Singer, Essen
Maus-anti-CD11b	FACS	STEMCELL Technologies SARL
Maus IgG1 k Isotypkontrolle	FACS, Blocken	ebioscience
Maus IgG2a k Isotypkontrolle	FACS, Blocken	ebioscience
Actin (I-19)	Western blot	Santa Cruz Biotechnology, Inc.

Tab. 4 Sekundäre Antikörper

Antikörper	Verwendung	Hersteller
Ziege-anti-Maus-HRP	Western blot	Santa Cruz Biotechnology, Inc.
Affe-anti-Ziege IgG-HRP	Western blot	Santa Cruz Biotechnology, Inc.
Ziege-anti-Maus-PE	FACS	ebioscience, antibodies-online GmbH
Affe-anti-Kaninchen-PE	FACS	Ebioscience

Tab. 5 Plasmide

Bezeichnung	Codiertes Protein	Antibiotika-resistenz	Bezogen von
pcDNA3.1(+)	-	Ampicillin Neomycin	Invitrogen Life technologies
pcDNA3.1(+)-CC3 wt	Humanes CEACAM3	Ampicillin Neomycin	Entelechon GmbH
pcDNA3.1(+)-CC3 Y230F	Humanes CEACAM3 Mutante: Y230F	Ampicillin Neomycin	Entelechon GmbH
pcDNA3.1(+)-CC3 Y241F	Humanes CEACAM3 Mutante: Y241F	Ampicillin Neomycin	Entelechon GmbH
pcDNA3 mycCard9	Humanes Card9	Ampicillin	William G. Kaelin über Addgene (Plasmidnr. 16253)
pMSCV-FlagBcl10	Humanes Bcl10	Ampicillin	Jon Ashwell über Addgene (Plasmidnr. 18718)
pGL4.32[lucZP/NF- κB-RE/Hygro] (NFκBReporterplasmid)	NF-κB-gekoppelte Luciferase	Ampicillin Hygromycin	Promega Corporation
pGL4.74[hRluc/TK] (Renillaluciferase- Reporterplasmid)	Renilla-Luciferase	Ampicillin	Promega Corporation

Tab. 6 Primer

Primer	Vorwärts-Sequenz (5' - 3')	Rückwärts-Sequenz (5' - 3')	Annealing- Temperatur	Produkt- länge
HPRT	GACCAGTCAACAGG GGACAT	AACACTTCGTGGGGTC CTTTTC	60 °C	195 bp

Primer	Vorwärts-Sequenz (5' - 3')	Rückwärts-Sequenz (5' - 3')	Annealing- Temperatur	Produkt- länge
CXCL8 Promotor	AA- GAAAACTTTCGTC- ATACTCCG	TGGCTTTTATATCAT CACCTAC	60°C	170 bp
Card9	CCCGCGTCTTCTCCA TGAT	CGTCCTCGGCCTTCAT GA	61 °C	369 bp
Bcl10	AGCCTCTACGA- GAGGGAAGG	AGGCGTCCTTCTTCAC TTCA	60 °C	329 bp
Malt1	GCCTCAGTTGCCTAG ACCTG	TTCAGAGACGCCATCA ACAC	60 °C	470 bp
Syk	GGGAGGAAGGCACA CCACTA	CAGGCACAGGGCGTA GGA	60 °C	450 bp
CEACAM1 Triple [Nr 159]	GCAACAGGACCACA GTCAAGACGA	L:GTGGTTGGAGACTG AGGGTTT S:TGGAGTGGTCCTGA GCTGCCG	64 °C	L 506 bp S 469 bp
CEACAM1 [HS24]	CCACTTCACAGAGTG CGTGT	ATTGTCTCTCGACCGC TGTT		284 bp cDNA/ 1194 bp gDNA
CEACAM3 [HS 18]	TTGCCAAACTGGA AGAACC	GTCCATCCGGCAGTAA ATGT	60 °C	209 bp
CEACAM3 [HS65]	ACCAATGCATCCCTG CTGAT	TTTGGCAAGGAGCAG GAAAC	60 °C	228 bp
CEACAM6 [Kanada]	TACTCAGCGTCAAAA GGAAC	AGAGACGTGGATCAT CATCGTGA	58 °C	353bp cDNA / 794 bp gDNA

Tab. 7 siRNA

siRNA	Bestellnummer	Hersteller
CEACAM3	SMARTpool: ON-TARGETplus CEACAM3 siRNA L-019510-02	Dharmacon
Kontrolle	ON-TARGETplus Non-targeting Pool D-001810-10	Dharmacon
Card9	Silencer® Select siRNA s34526	Ambion GmbH, life technologies
Syk	Silencer® Select siRNA s13681	Ambion GmbH, life technologies
Kontrolle	Silencer® Negative Control No. 3 siRNA AM4615	Ambion GmbH, life technologies

6.1.4 Zusammensetzung der verwendeten Puffer und Lösungen

Tab. 8 Zusammensetzung der verwendeten Medien für die Zellkultur

Medium	Zusammensetzung
Wachstumsmedium HEK Zellen	
DMEM	90 % (v/v)
FBS	10 % (v/v)
Kryokonservierungsmedium HEK Zellen	
DMEM	70 % (v/v)
FBS	20 % (v/v)
DMSO	10 % (v/v)
Wachstumsmedium NB4 und Hela Zellen	
RPMI	90 % (v/v)
FBS	10 % (v/v)
Kryokonservierungsmedium NB4 und Hela Zellen	
RPMI	70 % (v/v)
FBS	20 % (v/v)
DMSO	10 % (v/v)
Auftaumedium NB4 Zellen	
RPMI	80 % (v/v)
FBS	20 % (v/v)

Tab. 9 Zusammensetzung Puffer und Lösungen für PCR und Agarosegelelektrophorese

Puffer/Lösung	Zusammensetzung
5xTBE (Laufpuffer, pH 8,0 in A.dest)	
TRIS	89 mM
Borsäure	89 mM
EDTA	2 mM
Agarosegel (in 1x TBE)	
Agarose	1,5 g/ 100 ml

Puffer/Lösung	Zusammensetzung
Ethidiumbromid-Lösung	25 µg/100ml
GelRed Nucleic Acid Gel Stain, 10,000X in water	2 µl/ 100 ml

Tab. 10 Zusammensetzung Puffer und Lösungen für die Durchflusszytometrie

Bezeichnung	Zusammensetzung
Fixierlösung extrazelluläre Färbung	
Formaldehyd (35 %)	1 ml
Dulbecco's-PBS (1 x)	99 ml
Block-/Färbepuffer	
Dulbecco's PBS (1 x)	90 ml
FBS	10 ml
Waschpuffer	
Dulbecco's PBS (1 x)	99,8 ml
Tween20	200 µl

Tab.11 Zusammensetzung Puffer und Lösungen für ELISA

Bezeichnung	Zusammensetzung
Carbonatpuffer 0,1 M, pH 9,5 (Beschichtungslösung)	
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	4,2 g
Natriumcarbonat (Na ₂ CO ₃)	1,78 g
A. dest. ad	500 ml
Blockpuffer	
Dulbecco's PBS (1 x)	90 ml
FBS	10 ml
Waschpuffer	
Dulbecco's PBS (1 x)	99,95 ml
Tween20	50 µl
Stopplösung (2 N H₂SO₄)	
H ₂ SO ₄ (95-97 %ig)	27,47 ml
A. dest. ad	500 ml

Tab. 12 Zusammensetzung Puffer und Lösungen für Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP)

Bezeichnung	Zusammensetzung
Fixierlösung	
Dulbecco's-PBS	99 ml
Formaldehyd (35%)	1 ml
Neutralisationslösung	
Dulbecco's-PBS	
Glycin	0,125 M
Lysepuffer	
ChIP-Ripa Puffer	99 ml

Bezeichnung	Zusammensetzung
Proteinase-Inhibitor Cocktail Set I (100x)	1 ml
ChIP-Ripa Puffer	
Tris pH 7,1	10 mM
Natriumchlorid	150 mM
Nonidet P-40	1 % (v/v)
Desoxycholat	1 % (v/v)
SDS 10%ig	0,1 % (v/v)
A. dest.	
TE-Puffer	
Tris, pH 7,5	10 mM
EDTA	1 mM
A. dest.	
Hochsalzpuffer	
Natriumchlorid	2 M
Tris pH 7,5	10 mM
Nonidet P-40	1 % (v/v)
Desoxycholat	0,5 % (v/v)
EDTA	1 mM
A. dest.	
Eluierungspuffer	
TE-Puffer	
SDS 10%ig	1 % (v/v)

Tab. 13 Zusammensetzung Puffer und Lösungen für die Ko-immunpräzipitation

Bezeichnung	Zusammensetzung
RIPA Lysepuffer	
Tris pH 7,5	50 mM
Natriumchlorid	150 mM
Triton X-100	1 % (v/v)
Natrium-Desoxycholat	0,5 % (v/v)
Pervanadat	0,1% (v/v)
Phosstop	1% (v/v)
Proteinase-Inhibitor Cocktail Set I (100x)	1 % (v/v)
A. dest.	
Pervanadat-PBS Puffer	
Dulbeccos PBS (1x) ad	500 ml
Pervanadat	0,1% (v/v)
Phosstop	1% (v/v)
Proteinase-Inhibitor Cocktail Set I (100x)	1 % (v/v)

Tab. 14 Zusammensetzung Puffer und Lösungen für Westernblot

Bezeichnung	Zusammensetzung
Phosphoproteinwaschpuffer	
Natriumorthovanadat 98%ig, 200mM	5 ml
Natriumpyrophosphat, 150mM	50 ml
Natriumfluorid 99%ig, 1M	50 ml
Dulbeccos PBS (1x) ad	500 ml
Lysepuffer zur Proteinextraktion	
Phosphoproteinwaschpuffer	880 µl
Tris-HCl, pH 7,4, 500mM	100 µl
Nonidet® P-40 20%ig	1 %
Inhibitoren-Cocktail, 100x	10 µl
Sammelgelpuffer, pH 6,8	
Tris-HCl	6 g
A. dest. ad	100 ml
Trenngelpuffer, pH 8,8	
Tris	18,15 g
A. dest. ad	100 ml
Gelladepuffer nach Lämmli	
Sammelgelpuffer	1 ml
SDS (10%ig w/v)	1,6 ml
Glycerin	0,8 ml
Bromphenolblau 1%ig	0,4 ml
β-Mercaptoethanol 1%ig	10 µl
A. dest.	3,8 ml
Gelelektrophoresepuffer (5x)	
Tris-Base	15 g
Glycin	72 g
SDS (10%ig w/v)	5 g
A. dest. ad	1000 ml
Blotpuffer (10x)	
Tris-Base	30 g
Glycin	144 g
Methanol	20 % (v/v)
A. dest. ad	1000 ml
Blockpuffer	
Milchpulver	5 %
Dulbeccos PBS (1x) ad	500 ml
Waschpuffer	
TWEEN20	0,05 % (v/v)
Dulbeccos PBS (1x) ad	500 ml
Ponceau-S-Proteinfärbung	
Ponceau S	100 µg
Essigsäure 100%ig	5 ml
A. dest. ad	250 ml

Bezeichnung	Zusammensetzung
Sammelgel	
Sammelgelpuffer pH 6,8	1 ml
SDS 10% (v/v)	40 µl
Bis-Acrylamid 40%ig (w/v)	534 µl
TEMED	10 µl
Ammoniumpersulfat 10%ig	40 µl
A. dest. ad	4 ml
Trenngel	
Trenngelpuffer pH 8,8	2,5 ml
SDS 10% (v/v)	100 µl
Bis-Acrylamid 40%ig (w/v)	2,5 ml
TEMED	5 µl
Ammoniumpersulfat 10%ig	50 µl
A. dest. ad	10 ml

6.1.5 sonstige Verbrauchsmaterialien

Tab. 15 Verbrauchsmaterial

Bezeichnung	Verwendung	Hersteller
Einmalimpfösen	Ausplattieren von Bakterien	Roth
Film 5x7 inches	Western Blot	Thermo Scientific
Filter 50mm, 150 ml	Sterilfiltration	Nalgene
Filterpapier Whatman	Western Blot	VWR
Kryoröhrchen	Einfrieren von Zellen / Bakterien	Thermo Scientific
Küvetten, Kunststoff	Messung der optischen Dichte	Serva
Küvetten für Elektroporation, steril	Transfektion NB4-Zellen	Lonza
Küvetten, UV	RNA-Messung	Roth
Loch-Platten (6 / 12 / 24 / 48 Vertiefungen)	Zellkultur	Falcon
96-Loch-Platten weiß mit Abdeckfolie	RT-qPCR	Roche
LumiNunc™ F96 MicroWell™ Platte, weiß	Chemilumineszenzmessung	VWR
96-Loch-Platten Maxisorp	Elisa	Nunc
Membran Hybond ECL	Western Blot	Amersham

Bezeichnung	Verwendung	Hersteller
Multistepper-Aufsätze	Pipettieren	Ritter medical care
Pasteurpipetten (230 mm)	Absaugen von Flüssigkeiten	Brand
Petrischalenspatel Delta, steril	Ausplattieren von Bakterien Carl Roth GmbH	Roth GmbH
10 cm Petrischalen	Gießen der Selektionsagarplatten	BD Falcon
Pipetten (5, 10, 25 ml)	Pipettieren	TPP
Pipettenspitzen gestopft, ungestopft (10, 100, 200, 1000 µl)	Pipettieren	Eppendorf , VWR, Biozyme
Reaktionsgefäße (0,5, 1,5, 2ml)		Eppendorf, Sarstedt
Röhrchen (15, 50 ml)	Zell- und Bakterienkultur	Falcon
Röhrchen Polystyryl	Durchflusszytometrie	BD Biosciences
Spritze, 20ml	Sterilfiltrieren von Flüssigkeiten	B. Braun
Sterilfilter 0,20 Microliter	Sterilfiltrieren von Flüssigkeiten	Roth
Sterile Wattestäbchen	Überführen von Bakterien	NOBA Verbandmittel Danz GmbH Co KG
Urinbecher (100 ml)	Zellkultur	Sarstedt
Zellkulturflaschen T ₂₅ , T ₇₅	Zellkultur	Falcon

6.1.6 Geräte und Software

Tab. 16 Geräte

Bezeichnung	Hersteller
Elektrophoresekammer	Bio-Rad
Elisa-Reader Spectral Fluor Plus	Tecan
FACSCalibur™ Flow Cytometer	BD Biosciences
G:Box	Syngene
Gelhalterungssystem mit Klemmen, Kämmen usw.	BioRad
Inkubator HERA CELL 150	Heraeus
Inkubator Function Line BB16	Heraeus
Kamera Camedia C-4040 mit Ethidiumbromidfilter	Olympus
Laborwaage 822-33	Kern
Laborwaage R 160 P	Sartorius
LightCycler®480	Roche

Bezeichnung	Hersteller
Magnetrührer RCT basic	Ika-Labortechnik
Mikroskop Wilovert S	hund Wetzlar
Milli-RX75 – Anlage zur Herst. von A. dest.	Millipore Corporation
Multipette elektronisch	Eppendorf
Multistepper	Brand, Eppendorf
Scandrop	Analytik Jena
Nukleofektor II	Lonza
pH-Meter Seven easy	Mettler Toledo
Photometer	Eppendorf
Pipetboy	Hirschmann Laborgeräte, Integra
Pipettierhilfen (10, 100, 200, 1000 µl)	Eppendorf, Gibco
Powersupply BRL PS 305	Gibco
Pumpe Vacusafe	Integra
Rotierrad	Rettberg Laborbedarf
Schüttler	GFL 3032
Sonifier Branson 250	Heinemann Labortechnik
Sterilbank Hera Safe und antair BSK	Heraeus
Stickstofftank RSSeries	Taylor-Wharton
Thermal Cycler S1000™	BIO-RAD
Thermocycler T3	Biometra
Thermomixer 5436B	Eppendorf
Tischzentrifuge	neoLab
UV-Tisch Dunkelox	Syngene
UV-Transilluminator TFX-20M BRL	Gibco
Varioklav Dampfsterilisator	H+P Labortechnik GmbH
Vortexer REAX 2000	Heidolph
Wärmebad	GFL
Zentrifuge GS-6	Beckmann
Zentrifuge GS-15R	Beckmann
Zentrifuge 5415 C	Eppendorf

Bezeichnung	Hersteller
Zentrifuge für Platten 5403	Eppendorf

Tab. 17 Analysesoftware

Software-Bezeichnung	Hersteller
CellQuest™ Pro	Becton Dickinson (BD)
GraphPad Prism Version 5.0	GraphPad
LightCycler®480 Software Version 1.5.0.39	Roche
Magellan Data Analysis Software	TECAN Group Ltd
Scandrop	Analytik Jena
Syngene	Imgen Technologies
X-Fluor™	TECAN Group Ltd

6.2 Methoden

6.2.1 Zellbiologische Methoden

6.2.1.1 Zellkultur

Die im Folgenden beschriebenen Zellkulturarbeiten erfolgten unter sterilen Arbeitsbedingungen an einer Sicherheitswerkbank der Klasse II in einem gentechnischen Labor der Sicherheitsstufe 2. Um die Sterilität zu gewährleisten wurde der Arbeitsbereich vor Beginn der Arbeiten, bei Bedarf und bei Beendigung mit 70% Ethanol wischdesinfiziert. Es wurden ausschließlich sterilverpackte oder autoklavierte Materialien und sterilfiltrierte Lösungen verwendet.

Die Kultivierung der Zellen erfolgte in einem CO₂-Begasungsbrutschrank im offenen System bei 37 °C, 5 % CO₂ und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95 %. Alle Zellkulturmedien wurden bei 4 °C aufbewahrt und vor ihrer Verwendung auf 37°C im Wasserbad erwärmt.

Isolierung humaner Granulozyten

Humane Granulozyten wurden, entsprechend der Richtlinien der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Charité Universitätsmedizin Berlin, aus dem peripheren Blut gesunder Spender mittels Dichtegradientenzentrifugation isoliert. Nach Hersteller-

protokoll wurden in einem 50 ml Falcontube 20 ml 1-Step®Polymorph vorsichtig mit 20 ml EDTA-versetztem Blut überschichtet. Eine Vermischung der beiden Schichten ist zwingend zu vermeiden. Anschließend wurden die Proben für 45 min bei 500 x g und 18-22°C in einem Ausschwingrotor ohne Bremse zentrifugiert. Nach der Auftrennung befinden sich die mononukleären Zellen in der oberen Bande am Übergang zwischen Probe und Trennmedium, die polymorphnukleären Granulozyten in der darunterliegenden Bande und die Erythrozyten am Boden des Gefäßes.

Die polymorphnukleäre Fraktion wurde mit Hilfe einer Pasteurpipette abgezogen und durch Zugabe des gleichen Volumens 0,45% NaCl die isotonischen Verhältnisse wiederhergestellt. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen (400 x g, 10 min) und in 1 ml Zellkulturmedium pro 10^7 Zellen aufgenommen.

Kultivierung und Subkultivierung der promyelozytischen Suspensionszelllinie NB4

Die Subkultivierung der NB4 Zellen erfolgte alle 2-3 Tage bei einer maximalen Zelldichte von 1×10^6 pro ml. Die Zellen wurden bei 200 x g für 5 min zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Pellet in vorgewärmten Wachstumsmedium mit einer Dichte von $0,4-0,5 \times 10^6$ Zellen pro ml resuspendiert und in neue Zellkulturflaschen überführt. Bei Bedarf, um das Zellwachstum anzuregen, wurden die Zellen nach dem Zentrifugieren in PBS gewaschen.

Um die promyelozytischen Zellen in Richtung Granulozyten auszudifferenzieren, erfolgte die Zugabe von 2 μ M All-trans-Retinolsäure (ATRA) ins Wachstumsmedium für 3 Tage, anschließend standen die differenzierten Zellen für Experimente zur Verfügung.

Kultivierung und Subkultivierung der adhärenenten Zelllinien HEK293 und HeLa

Die Subkultivierung der HEK293 Zellen sowie der HeLa Zellen erfolgte alle 3-4 Tage bei einer Konfluenz von ca. 95%. Das Zellkulturmedium wurde abgesaugt, der Zellrasen vorsichtig mit PBS gewaschen (10 ml/75 cm²-Flasche) und die Zellen anschließend mit Hilfe von Trypsin/EDTA-Lösung (1 ml/75 cm²-Flasche, 3 min Inkubation bei 37°C) abgelöst. Nach der Zugabe von Zellkulturmedium (4 ml/75 cm²) wurde die Zellsuspension in Zentrifugationsröhrchen überführt und bei 200 x g für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, die Zellen in vorgewärmten Wachstumsmedium resuspendiert und die Zellzahl bestimmt. Anschließend erfolgte die Aussaat der Zellen mit einer Konzentration von ca. 2×10^5 Zellen / ml in neue Zellkulturgefäße.

Kryokonservierung von Zellen

Für die Kryokonservierung adhärenter Zellen wurden ca. 90 % konfluente Kulturen gewaschen, trypsiniert und zentrifugiert. Da NB4 Zellen bereits in Suspension vorliegen wurden sie nur zentrifugiert und einmal mit 1x PBS gewaschen. Die Zellpellets wurden anschließend zu ca. 3×10^6 Zellen pro ml in Kryokonservierungsmedium resuspendiert und auf Kryoröhrchen aufgeteilt. Um Schäden durch Kristallisationsprozesse zu vermeiden, erfolgte das langsame Herunterkühlen der Kryoröhrchen mit Hilfe einer Kryobox mit Isopropanolfüllung (Nalgene freezing container, Thermo Fisher Scientificx, Inc.) für 24 h bei -80 °C. Anschließend wurden die Röhrchen in Flüssigstickstoff (-196 °C) umgelagert.

Auftauen von Zellen

Die Kryoröhrchen wurden unter Schwenken in einem Wasserbad bei 37 °C vollständig aufgetaut. Anschließend wurden die Zellen resuspendiert, in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt, tropfenweise mit 10 ml warmen Zellkulturmedium versetzt und 5 min bei 200 x g sedimentiert. Nach dem vorsichtigen Absaugen des Überstandes wurden die Zellen erneut in 10 ml warmen Kulturmedium aufgenommen und in eine entsprechende Zellkulturflasche ausgesät.

Bestimmung der Zellzahl

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden 20 µl Zellsuspension mit 20 µl Trypanblau vermischt und zur manuellen Zählung auf eine Neubauer-Zählkammer gegeben. Die Anzahl der Zellen wurde über zwei Großquadrate ermittelt und der Mittelwert errechnet. Die Zellzahl pro ml wurde dann wie folgt kalkuliert:

$$\text{Zellzahl/ml} = \text{Mittelwert} / \text{Verdünnungsfaktor} \times \text{Kammerkonstante} (10^4)$$

Alternativ erfolgte die Ermittlung der Zellzahl mit Hilfe eines automatischen Zellzählers (Luna Cell Counter von logos Biozym). Die Verwendung von Trypanblau dient dabei zur Einschätzung der Viabilität.

6.2.1.2 Transiente Transfektion von NB4 Zellen

Das zeitweilige Einbringen von RNA oder DNA in die Wirtszelle wird als transiente Transfektion bezeichnet. Dieses Verfahren wurde verwendet um die Expression von CEACAM3, Syk und Card9 mittels *small interfering* RNA (siRNA) in NB4 Zellen herunterzuregulieren. Desweiteren wurden CEACAM3 Wildtyp und CEACAM3 Mutante-kodierende Plasmide transient in NB4 Zellen eingebracht. Die Transfektion erfolgte jeweils als sogenannte Nukleofektion mit dem Amaxa® Cell line Nucleofector®Kit V (Lonza) nach Herstellerprotokoll. Dafür wurden 2×10^6 NB4 Zellen pro Ansatz vorsichtig in 100 µl Nucleofector®-Lösung resuspendiert und zügig 2 µg Plasmid-DNA bzw. siRNA dazu gegeben. Nach dem Transfer der Suspension in eine spezielle Küvette wurde diese im Nucleofector® II platziert und mit dem Programm X-001 die Transfektion durchgeführt. Anschließend wurden sofort rund 500 µl vorgewärmtes Medium in die Küvette gegeben und vorsichtig in eine kleine Flasche überführt. Die Konzentration wurde auf $0,3 \times 10^6$ Zellen pro ml eingestellt. Die Überprüfung der Knockdown-Effizienz bzw. der CEACAM Expression erfolgte nach 72 h. Im Anschluss wurden die Zellen für weitere Versuche verwendet.

6.2.2 Mikrobiologische Methoden

6.2.2.1 Bakterienkultur

Die im Folgenden beschriebenen Bakterienkulturarbeiten erfolgten unter sterilen Arbeitsbedingungen an einer Sicherheitswerkbank der Klasse II in einem gentechnischen Labor der Sicherheitsstufe 2. Um die Sterilität zu gewährleisten wurde der Arbeitsbereich vor Beginn der Arbeiten, bei Bedarf und bei Beendigung mit 70% Ethanol wischdesinfiziert. Es wurden ausschließlich sterilverpackte oder autoklavierte Materialien und sterilfiltrierte Lösungen verwendet. Lösungen, Abfälle und bakterienhaltige Flüssigkeiten wurden vor der Entsorgung autoklaviert.

Das Bebrüten beimpfter Agarplatten erfolgte in einem CO₂-Begasungsbrutschrank im offenen System bei 37 °C, 5 % CO₂ und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95 %. Die Inkubation von Flüssigkulturen erfolgte im Inkubationsschüttler bei 37°C.

Anlegen eines Moraxella catarrhalis – Glyzerolstocks zur Kurzzeitlegerung

Die für die Infektionsversuche verwendeten Bakterien stammen aus einem zuvor angelegten Arbeitsstock. Dafür wurde eine Impföse in den bei -80°C gelagerten Langzeitstock getaucht und dick auf Columbia Blutagarplatten ausgestrichen. Für die Anzucht der Deletionsmutante BBH18.1 wurde zuvor das Selektionsantibiotikum Chloramphenicol auf der Platte verteilt. Anschließend wurden die beimpften Platten für etwa 16 h bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert und die gewachsenen Bakterienkolonien wurden dann mit einer Impföse von der Platte abgenommen und in 1 ml BHI-Medium resuspendiert. Nach dem Untermischen von 1 ml Glyzerol 99,9 % wurde die Suspension in ein Kryoröhrchen überführt und für den kurzfristigen Gebrauch bei -20°C gelagert. Die Arbeitsstocks wurden alle 8 Wochen erneuert.

Anzucht von Moraxella catarrhalis

Zur Anzucht des jeweiligen *Moraxella catarrhalis* – Stamms wurden Bakterien aus dem -20 °C Glyzerolstock mit Hilfe einer Impföse auf einer Columbia-Blutagarplatte ausgestrichen. Anschließend wurde die Agarplatte für etwa 16 Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Am nächsten Tag wurde ein Viertel der gewachsenen Bakterienkolonien mit einer Impföse von der Agarplatte abgenommen, in 12,5 ml BHI-Medium in Suspension gebracht und anschließend bei 37 °C für etwa 2 h bis zum Erreichen der logarithmischen Wachstumsphase geschüttelt. Nach der Inkubation wurden die Bakterien bei 3500 rpm für 5 min zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 3 ml PBS resuspendiert. Die Bakterienkonzentration wurde mit Hilfe eines Spektralphotometers bei einer Wellenlänge von 405 nm ermittelt:

OD_{405nm} von 0,3 entspricht etwa 5×10^7 colony forming units (cfu) / ml

Stimulation der Zellen mit Moraxella catarrhalis

Nach der Aussaat der adhärenenten Zellen in Lochplatten. erfolgte die Bestimmung der Zellzahl bei einer Konfluenz von 80-100 % in einer repräsentativen Vertiefung (well) der Platte. Vor der Zugabe der Bakterien wurde das Kulturmedium durch zusatzfreies Zellkulturmedium ersetzt. Suspensionszellen und humane Granulozyten wurden entsprechend der Versuchsanordnung in der erforderlichen Konzentration in antibiotikafreiem Stimulationsmedium aufgenommen.

Anschließend erfolgte die Stimulation der Zellen mit der entsprechenden MOI (*multiplicity of infection*). So wurden für eine MOI von 50, aus der Bakteriensuspension 50 Bakterien pro Zelle auf die Zellen gegeben. Danach wurden die infizierten Zellen bei 37°C und 5% CO₂ für die entsprechende Versuchszeit inkubiert.

Bei der Verwendung von Inhibitoren und den CEACAM-blockenden Antikörpern wurden die Zellen vor der Infektion mit Bakterien für die jeweilige Zeit mit dem Inhibitor bzw. Antikörper vorinkubiert. Unstimulierte Zellen, denen nur das entsprechende Volumen bakterienfreies Stimulationsmedium zugesetzt wurde, dienten als Negativkontrolle.

6.2.2.2 CFU (colony-forming-units)-basierter Adhäsionsassay

Um die Adhäsion von *M. catarrhalis* an CEACAM3 zu untersuchen wurden stabil mit CEACAM3 Wildtyp –transfizierte Zellen, sowie zum Vergleich Leervektor-transfizierte Zellen, in 24 well-Platten ausgesät. Bei einer Konfluenz von 70-90 % wurden die Zellen in Duplikaten mit BBH18 bzw BBH18.1 mit einer MOI von 100 infiziert. Nach einer einstündigen Inkubation im Brutschrank wurden nicht gebundene Bakterien durch fünfmaliges Waschen mit PBS entfernt. Anschließend wurden die Zellen mit 250 µl Trypsin/EDTA abgelöst, 1 min gemixt und nach dem verdünnen auf Columbia-Agarplatten ausgestrichen. Am nächsten Tag wurden die Kolonien ausgezählt.

6.2.2.3 Moraxella catarrhalis-CEACAM-Pulldown

Mit Hilfe des „Moraxella catarrhalis-CEACAM-Pulldowns“ wurde die Bindung zwischen dem Moraxella Stamm BBH18 bzw. der Deletionsmutante und verschiedenen CEACAMs untersucht. Dieser Versuch wurde mit Unterstützung von Esther Klaile (Septomics, Universitätsklinikum Jena) wie in Heinrich et al. beschrieben durchgeführt (Heinrich, Heyl et al. 2016).

BBH18 und die UspA1-defiziente Mutante BBH18.1 wurden 16 h auf Columbia-Agarplatten und anschließend für 2 h bei 37°C in 50 ml BHI angezogen. Die rekombinanten extrazellulären Domänen der verschiedenen CEACAM Proteine (CEACAM1-Fc, CEACAM1-deltaN-Fc, CEACAM3-Fc, CEACAM6-Fc und CEACAM8-Fc (Klaile, Vorontsova et al. 2009, Singer, Opp et al. 2014) wurden mit dem gleichen Volumen 100 mM Glyzin (pH 2,2) versetzt und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert, dann wurde

das gleiche Volumen 1 M Tris-Hcl (pH 8,3) zugegeben. Die Bakterien wurden zweimal mit PBS gewaschen und die Pellets anschließend mit 2 µg rekombinantem CEACAM-Protein in 100 µl PBS für 3 h im Überkopfschüttler bei 4 °C rotiert. Die Überstände mit dem ungebundenen Protein wurden abgenommen und die Pellets zweimal mit je 1 ml PBS gewaschen. Im Anschluss wurden die an die Bakterien gebundenen Proteine durch die Zugabe von 40 µl 100 mM Glyzin (pH 2,2) eluiert und der pH durch Zugabe von 10µl 1 M Tris-HCl (pH8,3) angehoben. Die Auswertung der Proben erfolgte über den Nachweis der CEACAM-Proteine im Western Blot mit Hilfe des Kaninchen-anti-CEA Antikörpers der Firma DAKO.

6.2.3 Molekularbiologische Methoden

6.2.3.1 Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)

Die Durchführung der RT-PCR erfolgte wie bereits in der Doktorarbeit von Sabrina Zahradnik beschrieben (Zahradnik, 2014).

Zellyse und RNA-Aufreinigung

Die stimulierten Zellen wurden nach der entsprechenden Inkubationszeit einmal in 1 ml PBS gewaschen anschließend in 400 µl Lysis Solution aus dem nachfolgenden Kit lysiert. Im Anschluss wurde die RNA-Isolierung mit dem InnuPREP Kit der Firma Analytik Jena nach Herstellerprotokoll durchgeführt. Die Messung des RNA-Gehaltes erfolgte mit dem scandrop (Analytik Jena) bei einer Wellenlänge von 260 nm. Der RNA-Gehalt wurde mit folgender Formel berechnet:

$$OD_{260nm} \times 40 \times \text{Verdünnung}(25) / 1000 = \text{RNA } \mu\text{g} / \text{ml}$$

Aus dem Verhältnis OD_{260} (Optimum RNA Absorption) und OD_{280} (Optimum Protein Absorption) kann eine Verunreinigung der RNA mit Proteinen bestimmt werden. Als rein wurden dabei RNA-Protein-Quotienten zwischen 1,7 und 2,0 betrachtet. Die isolierte RNA wurde bei -80°C aufbewahrt.

Reverse Transkriptase Reaktion

Je Ansatz wurde 1 µg RNA eingesetzt. Dazu wurden die ermittelten RNA-Konzentrationen durch Zugabe von Ecotainer® Wasser so verdünnt, dass 1 µg totale RNA in 10 µl Wasser gelöst waren. Als Negativkontrolle diente das gleiche Volumen an Wasser ohne RNA. Anschließend wurden zu jeder Probe 10 µl Mastermix pipettiert:

10 µl	RNA-Probe	
4,2 µl	A.dest	
2,0 µl	10 x RT Puffer	
2,0 µl	10 x Random Primer	Mastermix
1,0 µl	MultiScribe Reverse Transkriptase	
0,8 µl	25 x dNTP Mix 100 mM	
<hr/>		
20µl	Probenvolumen	

Anschließend erfolgte die Reaktion im Thermocycler mit folgendem Programm: 10min bei 25°C, 120min bei 37°C, 5sek bei 85°C, Abkühlung auf 4°C. Anschließend wurden die Proben mit der enthaltenen cDNA mit 80 µl A.dest (Ambion) verdünnt. Die cDNA wurde dann bei -20°C aufbewahrt.

Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Das Prinzip der PCR ist die enzymatische Amplifikation eines DNA-Abschnittes zwischen zwei Oligonukleotid-Primern, die gegenläufig an komplementäre DNA-Stränge binden. Je Ansatz wurden 5 µl cDNA und 20 µl Mastermixe verwendet:

5 µl	cDNA-Probe	
13,375 µl	A.dest	
2,5 µl	Reaktionspuffer (10x)	
2,5 µl	Loading Dye	
0,5 µl	dNTPs (je 10 mM)	Mastermix
0,5 µl	Forward Primer (10 pmol/µl)	
0,5 µl	Reverse Primer (10 pmol/µl)	
0,125 µl	Perfect Taq Plus	
<hr/>		
25 µl	Probenvolumen	

Als Kontrolle diente eine PCR mit den Primern für HPRT. Gleichstarke HPRT Banden zeugen für gleichmäßige cDNA-Konzentration in den verschiedenen Ansätzen. Die eingesetzte cDNA wird zunächst bei 95°C denaturiert. Im folgenden Hybridisierungsschritt lagern sich die Oligonukleotid-Primer bei einer für sie spezifischen Temperatur (Annealing-Temperatur) an die DNA-Einzelstränge an. Bei einer Temperatur von 72°C erreicht die Polymerase optimale Bedingungen für die Synthese in 3'-5'-Richtung (Elongationsphase). Optimale Annealingtemperaturen und Zyklenzahlen wurden durch Gradienten-PCRs ermittelt. Die Durchführung der Gradienten-PCR entspricht der einer normalen Polymerase-Kettenreaktion, mit dem Unterschied, dass alle Ansätze für die verschiedenen Temperaturen aus derselben Probe stammen.

Auswertung RT-PCR / Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese ist ein Verfahren zur Auftrennung von DNA-Molekülen in einem konstanten elektrischen Feld. Die Agarose dient hierbei als interne Matrix, in welcher DNA-Moleküle aufgrund ihrer negativ geladenen Phosphatgruppen im Desoxyribose-Phosphat-Rückgrad im elektrischen Feld zur Anode wandern.

Die Agarose-Gelelektrophorese wurde im TBE-Puffersystem durchgeführt. Standardmäßig wurden 1,5 %ige Agarosegele verwendet. Unter Aufkochen wurde 1,5 g Agarose in 100 ml TBE-Puffer gelöst und nach dem Abkühlen 4 µl Ethidiumbromid bzw. 2 µl GelRed zugefügt. Anschließend wurde das Gel in eine Gelhalterung gegossen, welche mit Kämmen bestückt war, die als Platzhalter für 20 Geltaschen dienten. Nach Erstarren des Gels wurde dieses in eine mit TBE-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer überführt. Je 12 µl der DNA-Proben wurden in die Geltaschen pipettiert. Um nach Abschluss des Gel-Laufes die Länge und Menge der aufgetragenen DNA-Fragmente bestimmen zu können, wurde zusätzlich ein Referenzmarker (100 bp Ladder) aufgetragen. Die Elektrophorese wurde mit einer Spannung von 100V über eine halbe Stunde durchgeführt. Das im Gel enthaltene Ethidiumbromid bzw. GelRed interkaliert in die DNA und lässt sich aufgrund seiner fluoreszierenden Eigenschaften bei UV-Licht sichtbar machen. Die Dokumentation der Gele erfolgte mit einer Olympus Kamera mit vorgeschaltetem Ethidiumbromidfilter unter UV-Licht.

6.2.3.2 Quantitative - Real Time - PCR (q-RT-PCR)

Die Durchführung der q-RT-PCR wurde wie in der Doktorarbeit von Sabrina Zahradnik beschrieben vorgenommen (Zahradnik, 2014).

Die q-RT-PCR beruht auf dem Prinzip der herkömmlichen PCR und bietet zusätzlich die Möglichkeit der Quantifizierung, d.h. sie sagt nicht nur aus, ob ein bestimmter DNA-Abschnitt in einer Probe vorhanden ist, sondern bestimmt zugleich dessen Menge, die schon während der Reaktion, also nach jedem einzelnen Zyklus, erfasst werden kann.

Eine Möglichkeit, die Anzahl gebildeter DNA-Moleküle während der Reaktion zu messen, besteht in der Verwendung fluoreszierender Reporterfarbstoffe, die in die doppelsträngige DNA interkalieren. Mit Fortschreiten der PCR-Reaktion kommt es zu einem Fluoreszenzanstieg, der direkt proportional zur Zahl der vorhandenen Doppelstränge ist. Nach diesem Prinzip wurde der Farbstoff SYBR Green eingesetzt. Zur Prüfung der Spezifität wurden Schmelzkurvenanalysen durchgeführt. Fehlhybridisierungen konnten dadurch ausgeschlossen werden.

Die Quantifizierung der PCR beruht für beide Methoden auf der Berechnung des Fluoreszenz-Schwellenwertes, dem sogenannten Ct-Wert (engl. *Cycle Threshold* für Schwellenwert-Zyklus). Der Ct-Wert beschreibt den Zyklus, an dem die Reporter-Fluoreszenz erstmalig signifikant über die Hintergrund-Fluoreszenz ansteigt.

Die Zelllyse, RNA-Aufreinigung und Reverse Transkriptase Reaktion erfolgte wie für die RT-PCR beschrieben.

SYBR Green – q-RT-PCR

Ein Ansatz wurde stets als Triplet pipettiert und setzte sich wie folgt zusammen:

4,0 µl	cDNA-Probe	Mastermix
5,2 µl	A.dest	
10,0 µl	SYBR Green MM 2x	
0,4 µl	Forward Primer (10 pmol/µl)	
0,4 µl	Reverse Primer (10 pmol/µl)	
16 µl	Probenvolumen	

Optimale Annealingtemperaturen und Zyklenzahlen wurden durch Gradienten-PCRs ermittelt. Die Durchführung der Gradienten-PCR entspricht der einer normalen Polymerase-Kettenreaktion, mit dem Unterschied, dass alle Ansätze für die verschiedenen Temperaturen aus derselben Probe stammen.

Auswertung der q-RT-PCR

Die Auswertung erfolgte als relative Quantifizierung. Um Variationen in der Ausgangsmenge der eingesetzten RNA auszugleichen, wurde als interne Kontrolle das Housekeeping-Gen HPRT1 verwendet. Die HPRT1 (Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase 1) wird von eukaryonten Zellen ubiquitär und homogen exprimiert. Die Berechnung erfolgte nach der $\Delta\Delta C_t$ -Methode. Dabei werden die C_t -Werte der internen Kontrolle HPRT1 von denen des Ziel-Gens abgezogen. Dies ergibt den ΔC_t -Wert ($\Delta C_t = C_t \text{ Ziel-Gen} - C_t \text{ Referenz-Gen}$). Anschließend werden die ΔC_t -Werte der unstimulierten Kontrolle vom ΔC_t -Wert des Ziel-Gens abgezogen. Dies ergibt den $\Delta\Delta C_t$ -Wert. Der relative Expressionsunterschied einer Probe zwischen der Behandlung und der Kontrolle (Ratio), normalisiert zum Referenz-Gen und bezogen auf eine Standardprobe, ergibt sich aus der arithmetischen Formel $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Livak and Schmittgen, 2001).

6.2.3.3 Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP)

Mit Hilfe der Chromatin-Immunpräzipitation ist es möglich die Bindung von Transkriptionsfaktoren und anderen Proteinen an die Promotorregion eines zu untersuchenden Gens nachzuweisen (hier die Bindung der NF- κ B Untereinheiten p65 und c-Rel sowie der Polymerase II an den *cxc18* Promotor). In einem ersten Schritt werden die Zellen fixiert, was zu einer reversiblen Quervernetzung von Proteinen und DNA führt. Anschließend werden die Zellen lysiert, die DNA mittels Ultraschall fragmentiert und mit Hilfe spezifischer Antikörper die zu untersuchenden Proteine zusammen mit den gebundenen DNA Fragmenten immunpräzipitiert. Nach einem Proteinverdau erfolgt dann aus der ko-präzipitierten DNA die Amplifizierung der spezifischen Zielsequenz per PCR. Die ChIP wurde durchgeführt, wie bereits beschrieben (Heyl, Klassert et al. 2014):

Humane Granulozyten wurden mit einem CEACAM3- oder CEACAM1- blockenden Antikörper vorinkubiert und im Anschluss mit *M. catarrhalis* für 1 h inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen nach Zentrifugation in 1ml 1% Formalde-

hyd fixiert. Nach Neutralisation mit 1 ml 0,125M Glycin in kaltem PBS wurden die Zellen mit kaltem PBS gewaschen und das Zellpellet in 1 ml ChIP-Radioimmunpräzipitationsassay (RIPA)-Lysepuffer lysiert. Anschließend erfolgte die Fragmentierung des Chromatins mittels Ultraschall in Stücke mit einer Länge von einhundert Basenpaaren (je 4 mal 1 min Ultraschall, 1 min Pause, Schallintensität 50%), gefolgt von einer 20 minütigen Zentrifugation (14.000 rpm, 4°C). Die Lysate wurden aliquotiert (50 µl für den Input und dreimal 250µl für die Immunpräzipitation) und bei -80°C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

Für die Immunpräzipitation wurden je 250 µl Lysat mit 2µg Antikörper (NF-κB p65, c-Rel bzw. Polymerase II) über Nacht bei 4°C im Überkopfschüttler inkubiert. Zur Bindung der Immunkomplexe wurden am nächsten Tag 100 µl eines Protein A/G Sepharosegemisches (Protein A Sepharose 20µl, Protein G Sepharose 20µl, ChIP-RIPA Puffer 60 µl) zu den Proben gegeben und für 1-2 h bei 4°C über Kopf rotiert. Nach Ende der Inkubationszeit wurden die Sepharosebeads mit den gebundenen Immunkomplexen bei 14.000 x g für 1 min zentrifugiert und anschließend zweimal mit kaltem ChIP-RIPA-Puffer, einmal mit kaltem High-Salt-Puffer, noch einmal mit ChIP-RIPA-Puffer und zuletzt mit TE-Puffer gewaschen. Das Ablösen der Immunkomplexe von den Sepharosekügelchen erfolgte dann durch Zugabe von 55 µl Eluierungspuffer und einer 15 minütigen Inkubation bei 30°C. Nach dem Abzentrifugieren der abgelösten Beads wurden 50 µl des Überstandes in ein neues Reaktionsgefäß überführt, in das bereits 0,5 % RNase in 150 µl TE-Puffer vorgelegt wurde. Die Inputkontrollen der sonifizierten Lysate wurden zu 150 µl TE-Puffer mit 0,5 % RNase und zusätzlich 1 % SDS gegeben. Nach einer 30 minütigen Inkubation bei 37°C wurden die Proteine durch Zugabe von 2.5% Proteinase K gefolgt von zwölfstündiger Inkubation bei 37°C und sechsstündiger Inkubation bei 65°C verdaut. Die Aufreinigung der DNA erfolgte mit dem QIAquick PCR Purification Kit der Firma Qiagen gefolgt von der Amplifikation des CXCL8-Promotors in einer semiquantitativen PCR.

6.2.4 Ko-Immunpräzipitation

Bei dieser Methode wird *in vitro* mittels eines an Sepharosekügelchen-gekoppeltem Antikörpers ein spezifisches Antigen mitsamt seiner Interaktionspartner aus einer Lösung präzipitiert. Daher eignet sich diese sogenannte Ko-Immunpräzipitation auch zum Nachweis von Protein-Protein Wechselwirkungen.

Der Versuch wurde durchgeführt wie bei Sarantis and Gray-Owen beschrieben (Sarantis and Gray-Owen 2012). NB4 Zellen wurden 3 Tage mit ATRA (2 μ M) ausdifferenziert und pro Ansatz 1×10^7 Zellen/ ml für 15 min mit 1 mM PMSF vorinkubiert. Anschließend erfolgte die Stimulation mit *M. catarrhalis* (MOI 50) bzw. Pervanadat (5 μ l Orthovanadat+8 μ l H₂O₂ kurz bei RT inkubieren = Pervanadat, dieses 1:500 einsetzen)) als Kontrolle. Nach den entsprechenden Inkubationszeiträumen wurden die Zellen zweimal mit PBS-Pervanadat-Puffer gewaschen, in RIPA-Puffer lysiert und 20 min auf Eis inkubiert. Für die Immunpräzipitation wurden die Proben für 15 min bei 16.000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde mit dem CEACAM spezifischen Antikörper CEA von Dako (3 μ g/ ml) versetzt und 2 h bei 4°C rotiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von A/G-Sepharose Beads (20 μ l/20 μ l) und Überkopf Rotation bei 4°C über Nacht. Nach zweimaligem Waschen mit RIPA Puffer, wurden die Proben mit Lämmli-Puffer versetzt, 5 min aufgekocht, zentrifugiert und die Überstände mittels Western Blot auf CEACAM3 bzw. Syk untersucht.

6.2.5 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ermöglicht die qualitative und quantitative Analyse von Zellpopulationen. Dabei werden die Zellen mit Hilfe eines Flüssigkeitsstroms vereinzelt und anschließend nacheinander in einer Messzelle von einem Laser angestrahlt. Die Messung des Streulichtes und des induzierten Fluoreszenzlichtes gibt Aufschluss über die Größe, Granularität und Fluoreszenz der einzelnen Zelle. Die Fluoreszenz entsteht durch die Bindung spezifischer Fluorochrom-gekoppelter Antikörper an die entsprechenden Antigene auf oder in der Zelle. Dabei ist die Fluoreszenzintensität proportional zu der Menge an gebundenen Antikörpern und lässt somit einen Rückschluss auf die Expressionsdichte der zu untersuchenden Proteine zu.

Extrazelluläre Färbung

Für die Analyse der Oberflächenexpression von CEACAM3 und CD11b wurden je 1×10^6 Granulozyten oder NB4 Zellen in 1 % Formaldehydlösung auf Eis fixiert. Für die Färbung wurden in einer 96-well Spitzbodenplatte je 3×10^5 Zellen in 50 μ l Block-/Färbepuffer aufgenommen, 10-15 min inkubiert und anschließend 1,5 μ g Primärantikörper dazu gegeben. Nach 30-45 minütiger Inkubation bei RT wurden die Zellen

zweimal mit Blockpuffer gewaschen und erneut in je 50 µl Blockpuffer aufgenommen. Nach der Zugabe des Phycoerythrin (PE)-gekoppelten Sekundärantikörpers (1:50) und 20-30 minütiger Inkubation im Dunklen bei RT wurden die Zellen zweimal mit Waschpuffer und im Anschluss einmal mit PBS gewaschen.

Intrazelluläre Färbung

Für die Analyse der Syk-Phosphorylierung wurden je 1×10^6 Granulozyten im Anschluss an die Infektion mit *M. catarrhalis* mit Cytofix/Cytoperm fixiert sowie permeabilisiert und 20 min auf Eis inkubiert. Für die Färbung wurden in einer 96-well Spitzbodenplatte je 3×10^5 Zellen in 50 µl PermWash aufgenommen, 10-15 min inkubiert und anschließend 1,5 µg Primärantikörper dazu gegeben. Nach 30-45 minütiger Inkubation bei RT wurden die Zellen zweimal mit PermWash gewaschen und erneut in je 50 µl PermWash aufgenommen. Bei jedem Waschschrift wurden die Zellen vor der Zentrifugation 5 min im Waschpuffer (PermWash) inkubiert um die Diffusion ungebundener Antikörper zu erleichtern. Nach der Zugabe des Phycoerythrin (PE)-gekoppelten Sekundärantikörpers (1:50, bzw. 1:200) und 20-30 minütiger Inkubation im Dunklen bei RT wurden die Zellen dreimal mit PermWash mit jeweils 5 minütiger Inkubationszeit gewaschen.

Messung

Für die Auswertung wurden die Zellen in Durchflusszytometrie-Röhrchen in 250 µl PBS aufgenommen und im Durchflusszytometer gemessen. Dabei wurde entweder das FACSARIAII und die Software FACSDIVA v. 6.1.3 oder das FACSCALIBUR und die Software CELLQUEST PRO (BD Biosciences) verwendet.

6.2.6 Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest (ELISA)

Der ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) ist ein immunologisches Verfahren, mit dem spezifische Antigene, wie z.B. Chemokine aus Zellkulturüberständen, quantifiziert werden können. Dafür wird der Boden einer Testplatte mit einem spezifischen Antikörper beschichtet. Während der darauffolgenden Inkubation des Zellkulturüberstandes binden die im Überstand enthaltenden Antigene an den Plattenboden. Nach mehreren Waschschriften wird ein zweiter für dieses Antigen spezifischer, Peroxidasegekoppelter Antikörper dazugegeben. Nach ausgiebigen Waschschriften, erfolgt die

Quantifizierung über die photometrische Messung des enzymatischen Umsatzes des Substrats TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin) durch die Peroxidase und den Abgleich mit der Standardkurve.

Um die Konzentration an CXCL8 oder CCL3 in den Zellkulturüberständen zu bestimmen wurden die Zellen zunächst in Multiwellplatten für 16 h inkubiert, anschließend wurden die Platten zentrifugiert, die Überstände vorsichtig abgenommen und bis zur Verwendung bei -20°C oder -80°C (CCL3) gelagert. Für die Messung wurden Nunc-Immuno™ MaxiSorp™ 96-well Flachbodenplatten (VWR International) und die Kits „Human IL-8 ELISA Set“ von BD Biosciences bzw. „Human CCL3 (MIP-1 alpha) ELISA Ready-SET-Go“ von eBioscience strikt nach Herstellerangaben verwendet. Die Adsorption wurde mit dem Plattenlesegerät von Tecan und der Software Magellan ausgewertet.

6.2.7 Western Blot

Für den Nachweis der Knockdowneffizienz der Syk-siRNA sowie für die Auswertung der Ko-Immunpräzipitation wurde der Western Blot verwendet. Diese Methode dient dem spezifischen Nachweis von Proteinen aus einem Proteingemisch.

Sodium-Dodecyl-Sulfat-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE)

Mit Hilfe der SDS-PAGE erfolgt die Auftrennung der Proteine anhand ihrer Molekülgröße. Dabei bildet das SDS mit den Proteinen negativ geladene Komplexe, die elektrophoretisch in einem engporigen Gel aufgetrennt werden können. Zuerst wurden die Proben mit Lämmli-puffer versetzt und für 8 min bei 95°C im Thermoschüttler denaturiert. Anschließend wurden je circa 20 µl der Probe in die Taschen eines Polyacrylamidgels pipettiert, zusätzlich wurde ein Größenmarker mitgeführt. Die Proteinauftrennung erfolgte dann für 1 h bei 25 mA.

Western Blot

Im Anschluss an die SDS-PAGE werden die Proteine aus dem Gel über Elektrophorese auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und dort durch hydrophobe Wechselwirkungen immobilisiert. Die Größenauftrennung der Proteine bleibt dabei erhalten, so dass im Anschluss die zu untersuchenden Proteine mittels spezifischer Antikörper nachgewiesen werden können. Dieser Prozess wird als Western Blot bezeichnet.

In dieser Arbeit wurde das Verfahren des Nassblottens verwendet. Dabei wird das Gel nach der SDS-PAGE vorsichtig entnommen und luftblasenfrei auf eine Nitrozellulosemembran gelegt. Filterpapier und Schwamm wurden in Transferpuffer getränkt und auf und unter die Membran gelegt. Dieses Sandwich wurde anschließend in die Blotvorrichtung gespannt und in die mit eiskaltem Transferpuffer gefüllte Blotkammer gestellt. Der Transfer erfolgte dann für 1 h bei 100 V. Zur Überprüfung der Transfereffizienz wurde die Membran standardmäßig mit Ponceau S (30 s) gefärbt. Nach dem Entfärben über mehrere Waschschriffe wurden die unspezifischen Bindestellen mit Blockpuffer abgesättigt (1 h). Anschließend wurde der Primärantikörper dazu gegeben und die Membran über Nacht bei 4 °C auf dem Taumelschüttler geschwenkt. Am nächsten Tag wurde die Membran dreimal je 10 min mit Waschpuffer gewaschen und anschließend in Blockpuffer für 1 h mit dem Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper inkubiert. Nach erneutem dreifachem Waschen wurde die Membran für 5 min in dem Peroxidase Substrat ECL inkubiert. Das in der Lösung enthaltende Luminol wird von der Peroxidase umgesetzt und die resultierende Chemilumineszenz durch die Belichtung eines Films nachgewiesen. Als Referenzprotein diente Aktin.

6.2.8 Messung der NF-κB Aktivierung in HEK293 Zellen

Der Luciferase Reportergen Assay wurde genutzt um die Aktivierung von NF-κB auf Transkriptionsebene zu untersuchen. Dabei wird ein NF-κB Luciferase Genreporter-Plasmid verwendet, welches „Response Elements“ enthält, an die aktiviertes NF-κB bindet. Dadurch wird die Expression eines Luciferasegens von *Photinus pyralis* induziert. Die enzymatische Aktivität dieser Luciferase ist proportional zur Menge des exprimierten Enzyms und lässt so eine Aussage zur Stärke der NF-κB Aktivierung zu. Die NF-κB Aktivierung wurde durchgeführt wie bereits bei Gross et al. und in der Doktorarbeit von Kerstin Heyl beschrieben (Gross, Gewies et al. 2006; Heyl 2014).

Transiente Transfektion von HEK293

Für die transiente Transfektion wurde das GeneCellin Transfektionsreagenz von BioCellChallenge mit dem entsprechenden Herstellerprotokoll verwendet. Am Tag vor der Transfektion wurden die Zellen in einer Dichte von 3×10^5 / ml in 48 well-Lochplatten ausgesät (250 µl/well), das entspricht einer Konfluenz von 60-70% am Transfektionstag. Die Plasmid-DNA wurde in DMEM ohne Zusatz verdünnt (50

µl/well), GeneCellin dazugegeben (1 µl/well), der Ansatz sofort 2-3 s gemixt und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Pro Well wurden anschließend 50 µl des Transfektionsansatz langsam eingetropft, die Platten vorsichtig geschwenkt und im Brutschrank inkubiert. Insgesamt wurden 240 ng Plasmid-DNA pro Ansatz verwendet, bestehend aus der Summe der eingesetzten Plasmid-DNA (NF-κB Reporter - und Renilla Plasmid je 50 ng, CEACAM3 Wildtyp oder Mutante je 100 ng, Card9 und Bcl10 je 20 ng pro Well) und bei Bedarf aufgefüllt mit Leervektor um die DNA Menge konstant zu halten. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen für 5 h mit *M. catarrhalis* (MOI 50) infiziert. Danach wurde das Medium abgesaugt und die HEK293 Zellen in je 50 µl 1x Lysepuffer (aus dem Kit Luciferase Reporter Gene Assay, high sensitivity von Roche Applied Science, Mannheim, Deutschland) lysiert und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Für die Auswertung am folgenden Tag wurden die Lysate über Nacht bei 4°C gelagert.

Luciferase Reporter Gen Assay

Für die Messung der Luciferaseaktivität wurde das Kit „Luciferase Reporter Gene Assay, high sensitivity“ von Roche Applied Science genutzt. Je 10 µl Lysat und 20µl Luciferase-Substrat wurden in eine Vertiefung einer weißen 96 well- Flachbodenplatte pipettiert und sofort die Lumineszenz mit dem Plattenlesegerät von Tecan gemessen. Um sicherzustellen, dass die Transfektionseffizienz in allen wells vergleichbar ist, wurden die Zellen zur gleichen Zeit auch mit einem *Renilla*-Plasmid transfiziert. Dieses codiert die *Renilla* –Luciferase, welche konstitutiv exprimiert wird und zur Normalisierung verwendet werden kann. Die Aktivität der *Renilla*-Luciferase wurde mit Hilfe des „*Renilla*-Luciferase Assay Systems“ von Promega Corporation gemessen. Je 10 µl Lysat und 10µl *Renilla* Luciferase-Substrat wurden in eine Vertiefung einer weißen 96 well- Flachbodenplatte pipettiert und sofort die Lumineszenz mit dem Plattenlesegerät von Tecan gemessen. Nach der Normalisierung wurden die Werte als relative Lichteinheiten (RLU, *relative light units*) dargestellt.

6.2.9 Degranulationsassay – Nachweis der Myeloperoxidaseaktivität

Um die Freisetzung der neutrophilen primären Granula zu messen, wurde ein schneller, direkter, quantitativer colorimetrischer Assay verwendet, der auf der Messung der

Myeloperoxidase (MPO) – Aktivität im Überstand beruht. Als Substrat wird dabei 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) genutzt.

Die primären humanen Granulozyten wurden isoliert und jeweils 5×10^6 Zellen in 500 μ l Phenolrot-freiem Medium aufgenommen. Nach 5 minütiger Inkubation mit 5 μ g/ml Cytochalasin B (Sigma) bei Raumtemperatur wurden die Zellen mit den entsprechenden blockenden Antikörpern vorbehandelt (30 μ g/ml, 1 h) und anschließend mit *M. catarrhalis* MOI 50 infiziert und 1 h im Brutschrank inkubiert. Nach dem Abzentrifugieren der Zellen und Bakterien wurden 50 μ l des Überstandes in einer Flachbodenplatte mit 150 μ l TMB Peroxidase Substrat (BD Biosciences) gemischt und 30 min im Dunklen inkubiert. Nach dem Abstoppen der Reaktion durch die Zugabe von 50 μ l 2N H₂SO₄ wurden die Platten spektrofotometrisch im TECAN Plattenlesegerät bei 450 nm ausgewertet.

6.2.10 Nachweis der Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies

In dieser Arbeit wurde die Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies beim sogenannten oxidativen Burst mittels Durchflusszytometrie nachgewiesen. Dabei wurde die Oxidation des zellpermeablen, nicht-fluoreszierenden 2', 7'-Dichlorodihydrofluoreszein Diacetat (DCFH-DA) zum hoch-fluoreszierendem 2', 7'-Dichlorofluoreszein (DCF) gemessen.

Die primären humanen Granulozyten wurden isoliert, 1×10^6 Zellen in 200 μ l Medium aufgenommen und im Dunklen für 30 min mit 10 μ g/ml DCFH-DA (Sigma) vorinkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit *M. catarrhalis* für 1 h mit einer MOI 100 infiziert, nach Abschluss der Inkubationszeit zentrifugiert und in PBS resuspendiert. Die Fluoreszenz des zu DCF oxidiertem DCFH-DA wurde mittels Durchflusszytometrie bestimmt.

6.2.11 Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH)

Diese Methode wurde verwendet um biologisch aktive Bakterien innerhalb humaner Granulozyten nachzuweisen. Bei der FISH werden Fluoreszenz-markierte Oligonukleotidsonden verwendet, die sequenzabhängig an die jeweilige Zielstruktur in den fixierten morphologisch intakten Bakterien binden.

Der Versuch wurde durchgeführt wie in Heinrich et. al beschrieben (Heinrich, Heyl et al. 2016). Humane Granulozyten wurden für 0, 2 und 4 Stunden mit *M. catarrhalis* inkubiert und anschließend in 3.7% (v/v) Formaldehyd in PBS (pH 7,4) und 50% (v/v) Ethanol für mindestens 24 h bei 4°C fixiert. Alle weiteren Schritte wurden freundlicherweise von der Arbeitsgruppe von Frau PD Dr. Annette Moter, vom Biofilmzentrum des Deutschen Herzzentrums, durchgeführt. Für die FISH wurden die Zellen in Kunstharz, einem kalt polymerisierenden Methacrylat eingebettet (Moter, Leist et al. 1998) und in 2 µm dünne Schichten geschnitten. Anschließend wurden 20 µl Hybridisierungslösung (0,9 M NaCl, 20 mM Tris HCl, 0,01 SDS, 40% Formamid, 20 pmol von jeder Sonde und DAPI) auf die präparierten Schnitte gegeben. Es wurde die pan-bakterielle Sonde EUB338 und simultan die Nonsense Sonde NON338 verwendet (Biomers, Ulm, Deutschland). Zur Orientierung wurde der unspezifische fluoreszierende Farbstoff 4,6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) genutzt, der in die DNA interkaliert und somit Bakterien und Granulozyten anfärbt. Nach zweistündiger Inkubation in einer dunklen, feuchten Kammer bei 50°C wurden die Präparate mit destilliertem Wasser gespült, luftgetrocknet und mit Eindeckmedium (Vectashield mounting medium, Vector Laboratories, Burlingame, CA) und Deckglas versehen. Im Anschluss wurden die Präparate mit Hilfe eines Epifluoreszenzmikroskops (Axioplan 2, Carl Zeiss, Jena, Deutschland) ausgerüstet mit Bandpass-Filtern (AHF Analysentechnik, Tübingen, Deutschland) und Apoptom (Carl Zeiss, Jena, Deutschland) ausgewertet.

6.2.12 Elektronenmikroskopie

Für die elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden humane Granulozyten isoliert und mit *M. catarrhalis* stimuliert. Nach der entsprechenden Inkubationszeit wurden die Zellen vorsichtig zweimal mit PBS gewaschen und in 2.5 % Glutaraldehyd in Phosphatpuffer (0,06 M, pH 7,3) aufgenommen. Im Anschluss wurden die fixierten Proben zur Multi-User Abteilung Elektronenmikroskopie des Instituts für Vegetative Anatomie der Charité transportiert und dort freundlicherweise von Frau Petra Schrade präpariert, wie beschrieben in (Slevogt, Seybold et al. 2007) und zum Teil auch mikroskopiert. Die entstandenen Transmissions- und Rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden dann im Rahmen dieser Doktorarbeit weiter ausgewertet und bearbeitet.

6.2.13 Statistik

Sofern nicht anders beschrieben stammen alle Daten aus mindestens drei unabhängig durchgeführten Versuchen und wurden als Mittelwerte \pm Standardabweichung dargestellt. Signifikanzen wurden mit Hilfe des „One-way ANOVA Test“ gefolgt von dem „Newman-Keuls-Posttest“ ermittelt. Ein p-Wert von $< 0,05$ wird als signifikant angenommen. Für die statistische Analyse und Darstellung der Diagramme wurde die Software „Prism5.0“ von GraphPad verwendet. Die Abbildungen von Durchflusszytometrie, Western Blot, PCR und ChIP-Analysen sind jeweils ein repräsentatives Ergebnis aus wenigstens drei unabhängig durchgeführten Experimenten.

7 Ergebnisse

7.1 Die Interaktion von *Moraxella catarrhalis* mit humanen Granulozyten

7.1.1 Clusterbildung von *Moraxella catarrhalis* auf der Zelloberfläche von humanen Granulozyten

Humane Granulozyten wurden mit *Moraxella catharralis* inkubiert und die Interaktion mittels Rasterlektronenmikroskopie betrachtet (Abb. 6).

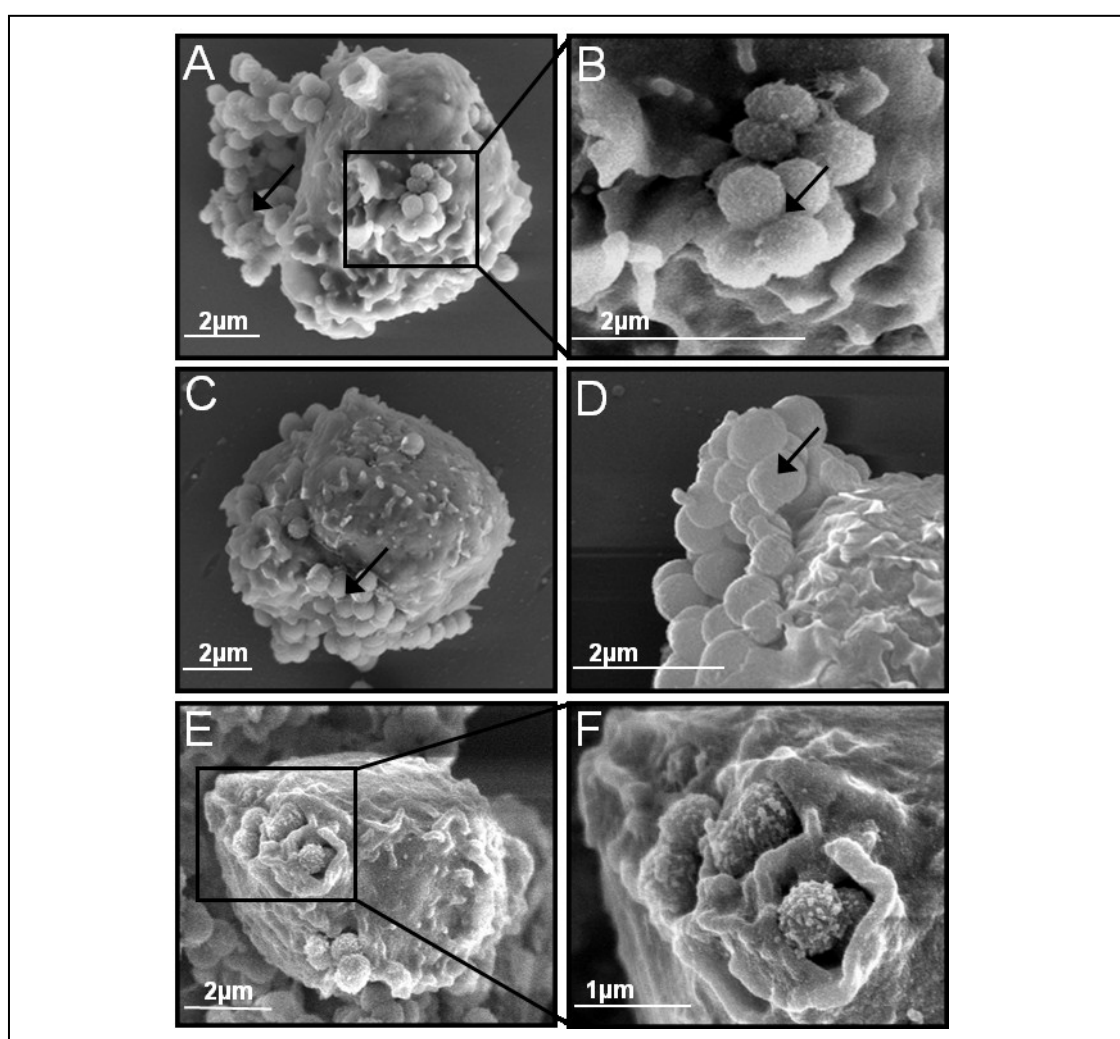


Abb. 6 Interaktion von *M. catarrhalis* BBH18 mit primären humanen Granulozyten. (A-D) Raster-elektronenmikroskopie: Adhärenente Bakterien bilden mehrzellige, traubenförmige Aggregate (Pfeile) auf der Zelloberfläche nach zwei- (A, B), vier- (C) und sechstündiger Inkubation mit MOI 50. (E, F) Lamellipodienartige Strukturen auf der Zelloberfläche humaner Granulozyten nach zweistündiger Inkubation mit *M. catarrhalis* (MOI 50). Die Daten sind repräsentativ für eins von zwei unabhängigen Experimenten

Es zeigte sich, dass die Bakterien in der Lage sind, an der granulozytären Zelloberfläche zu binden. Nach zwei-, vier und sechsständiger Inkubation konnten mehrzellige, traubenförmige Aggregate auf der Zelloberfläche dargestellt werden. Sowohl Billker et al. als auch Buntru et al. haben gezeigt, dass CEACAM3-exprimierende HeLa Zellen und auch primäre humane Granulozyten CEACAM3-vermittelt Lammellipodien ausbilden, die zu einer effizienten Aufnahme von *Neisseria gonorrhoe* in die Zellen führen (Billker, Popp et al. 2002, Buntru, Roth et al. 2012). In Abb. 1 E und F sind ebenfalls lamellipodienartige Membranausstülpungen an den bakteriellen Bindungsstellen zu erkennen.

7.1.2 Phagozytose von *Moraxella catarrhalis* durch humane Granulozyten

Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen, nach sechsständiger Inkubation humaner Granulozyten mit *M. catarrhalis*, zeigen phagozytierte Bakterien innerhalb der Zellen (Abb. 7 A, B). Hinsichtlich der Anzahl phagozytierter Bakterien pro Zelle, konnte kein Unterschied zwischen Zellen mit oder ohne einstündige Vorinkubation mit einem CEACAM3-blockenden Antikörper festgestellt werden (Abb. 7 C).

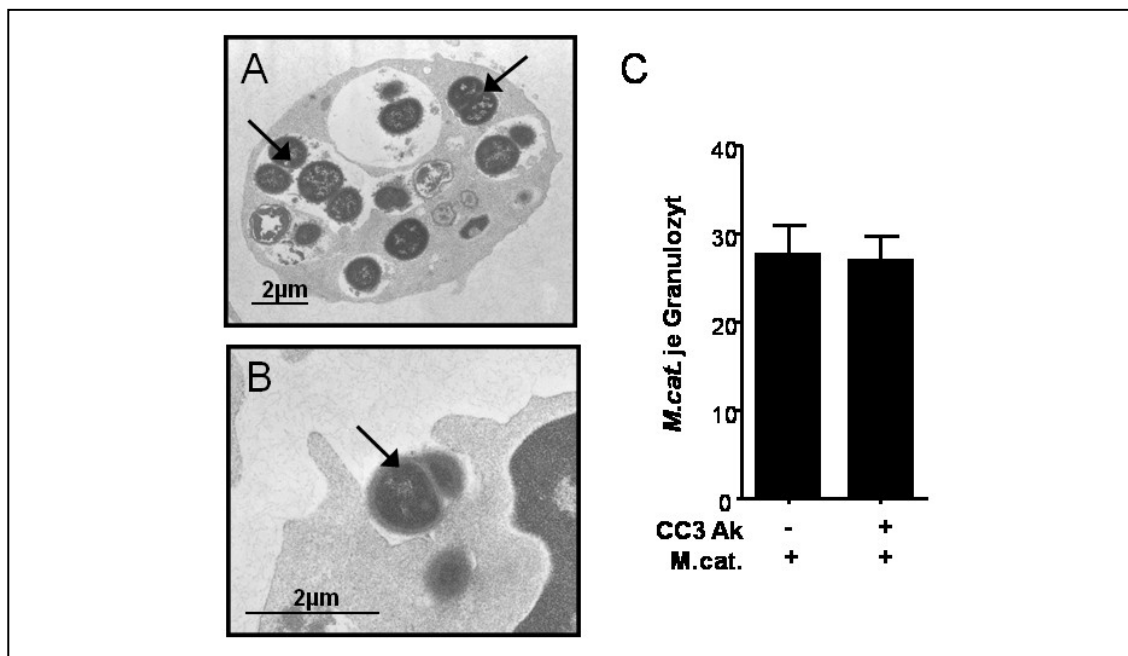


Abb. 7 Phagozytose von *M. catarrhalis*. (A, B) Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen der Phagozytose von *M. catarrhalis* durch humane Granulozyten nach sechsständiger Inkubation (MOI 50). (C) Auszählung der phagozytierten Bakterien in transmissionsmikroskopischen Aufnahmen von je 10 Granulozyten, nach sechsständiger Inkubation mit *M. catarrhalis* MOI 50 mit und ohne Vorinkubation (1h, 30 µg/ml) mit dem CEACAM3-blockenden Antikörper [Col-1]. Die Daten sind repräsentativ für zwei unabhängige Experimente.

7.1.3 Intrazellulärer Nachweis biologisch aktiver Bakterien in humanen Granulozyten

Zum Nachweis der biologischen Aktivität der phagozytierten Moraxellen wurde der Ribosomengehalt mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung bestimmt. Um eine direkte Korrelation zwischen der Fluoreszenzintensität der bakteriellen Sonde und der biologischen Aktivität bzw. Vitalität nachzuweisen, wurden *Moraxella* Kulturen mit der pan-bakteriellen 16sRNA Sonde EUB338Cy3 (orange Abb. 8 B, E, H) hybridisiert, die Nukleinsäuren wurden mit DAPI (blau, Abb. 8 C, F, I) angefärbt, während die grüne Hintergrundautofluoreszenz genutzt wurde um Detritus abzugrenzen (grün, Abb.8 A, D, G).

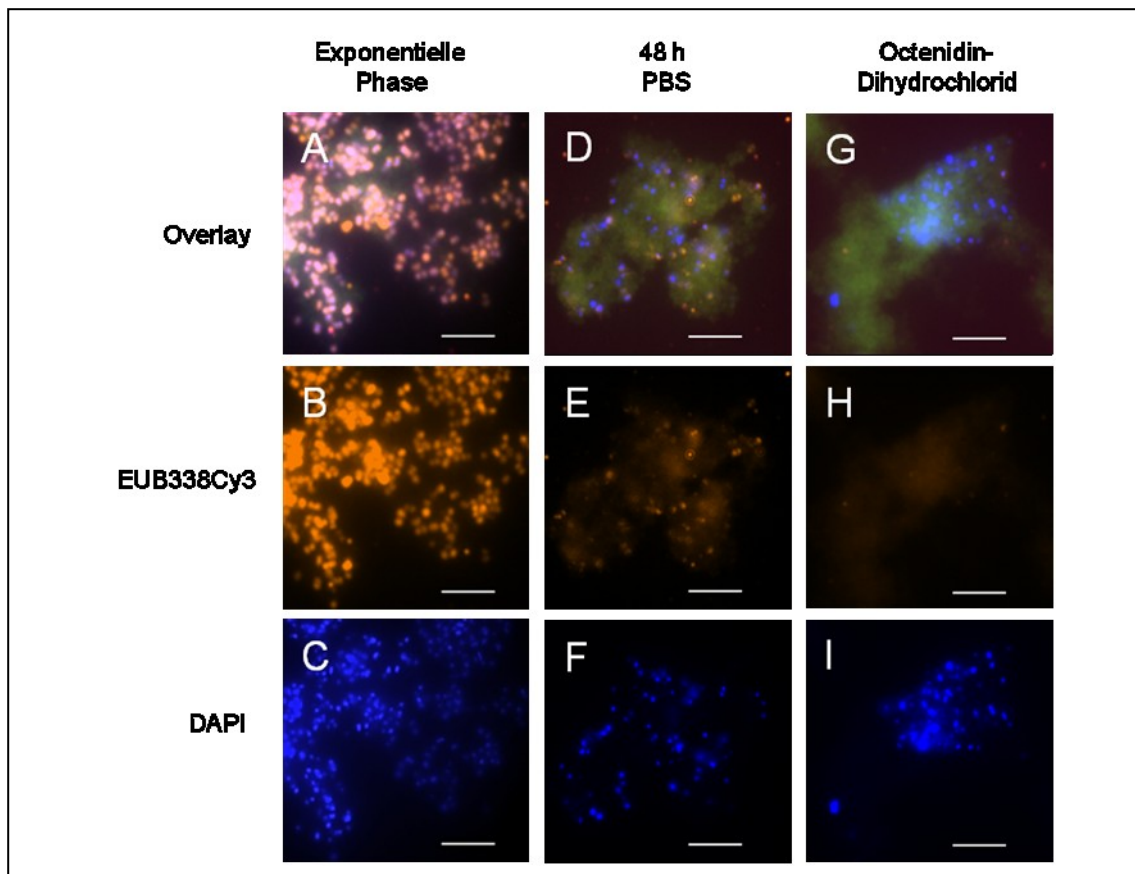


Abb. 8 Korrelation der FISH Signalintensität mit dem Ribosomengehalt und der Aktivität von *M. catarrhalis*. Für die Hybridisierung wurde die pan-bakterielle Sonde EUB338Cy3 (orange B, E, H) verwendet, Nukleinsäuren wurden mit DAPI (blau, C, F, I) angefärbt. (A, D, G) Darstellung der Signalüberlagerung der Sonde, DAPI und der grünen Hintergrundfluoreszenz. (A, B, C) Exponentielle Wachstumsphase. (D, E, F) 48 h Inkubation in PBS. (G, H, I) Behandlung mit Octenidin-Dihydrochlorid und anschließende Inkubation in PBS. Die Daten stammen aus einem Experiment.

Während der exponentiellen Wachstumsphase waren die meisten Bakterien FISH positiv (Abb. 8 A, B, C). Ein Aushungern der Bakterien durch 48 stündige Inkubation in PBS, führte zu einem deutlich schwächeren FISH Signal, zusätzlich wirkten die Bakterien kleiner (Abb. 8 D, E, F). Nach dem Abtöten der Zellen mit Octenidin-Dihydrochlorid und anschließender Inkubation in PBS konnten keine FISH positiven Moraxellen innerhalb der DAPI positiven Bakterien detektiert werden (Abb. 8 G, H, I). In einem nächsten Schritt wurden humane Granulozyten mit *M. catarrhalis* (MOI 50) infiziert (Abb. 9) Nach 4 stündiger Inkubationszeit waren FISH positive und somit biologisch aktive Moraxellen sowohl mit der Zelloberfläche der Granulozyten assoziiert, als auch innerhalb der Granulozyten nachweisbar.

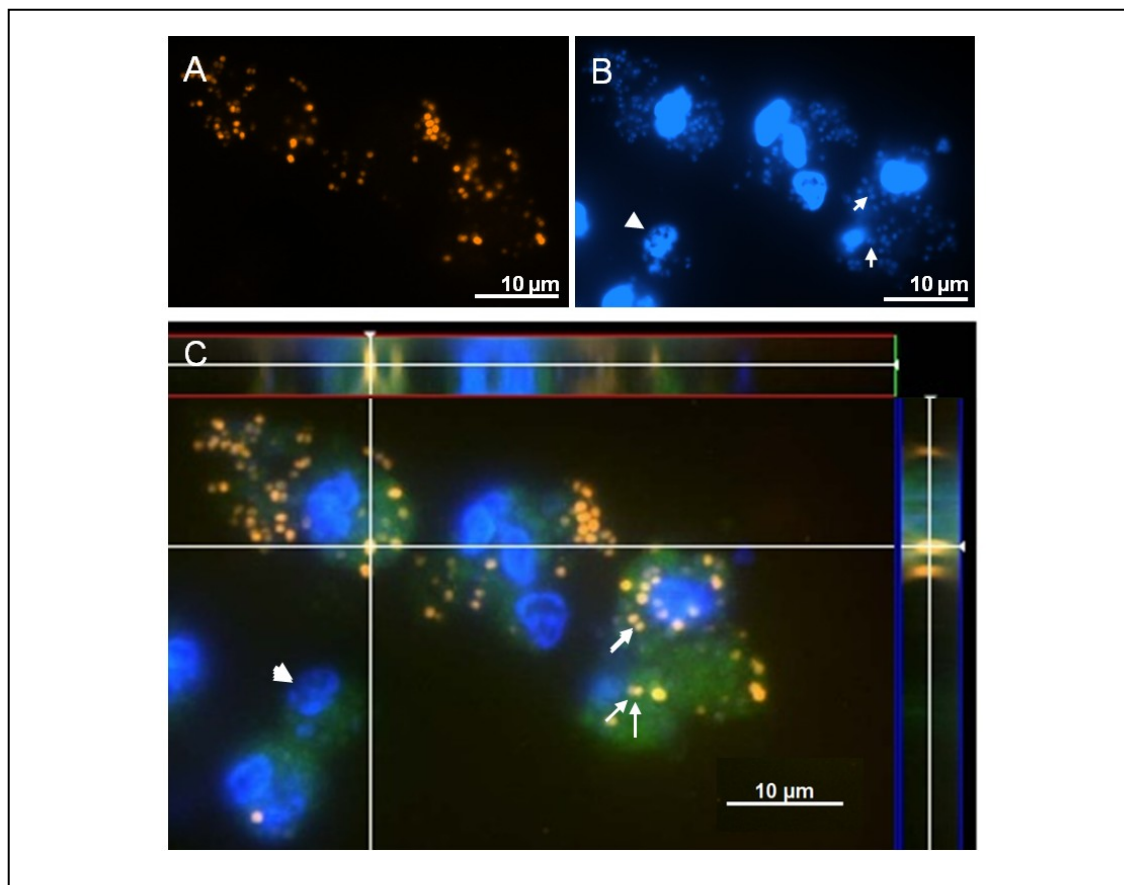


Abb. 9 FISH Aufnahmen der Bindung und Phagozytose von *M. catarrhalis*. FISH nach 4 stündiger Inkubation humaner Granulozyten mit *M. catarrhalis* MOI 50. (A) pan-bakterielle Sonde EUB338Cy3 (orange). (B) Färbung der Nukleinsäuren mit DAPI. (C) Überlagerung der Signale der Sonde (orange), DAPI (blau) und der granulozytären Autofluoreszenz (grün). Es finden sich biologisch aktive Moraxellencluster sowohl innerhalb als auch außerhalb der humanen Granulozyten (siehe seitliche Ansicht zwischen den roten und blauen Linien). Die Daten sind repräsentativ für zwei unabhängige Experimente.

7.2 Die Bedeutung von CEACAM3 für die proinflammatorische Immunantwort

7.2.1 Nachweis der Bindung von *Moraxella catarrhalis* UspA1 an CEACAM3

In einem ersten Schritt wurde, mittels Pulldown-Assay, die Fähigkeit von *M. catarrhalis* untersucht, an rekombinante CEACAM-FC Fusionsproteine zu binden. Dabei wurde sowohl der BBH18 Wildtypstamm, als auch die UspA1-Deletionsmutante verwendet. Abb. 10 A zeigt, dass der Wildtypstamm signifikant an rekombinantes CEACAM1, 3 und 6 bindet, während keine Bindung an CEACAM8 und an die Mutante CEACAM1-ΔN, deren N-terminale UspA1-Bindungsdomäne fehlt, erfolgt. Erwartungsgemäß ist auch keine Bindung zwischen CEACAMs und der UspA1 Deletionsmutante nachweisbar.

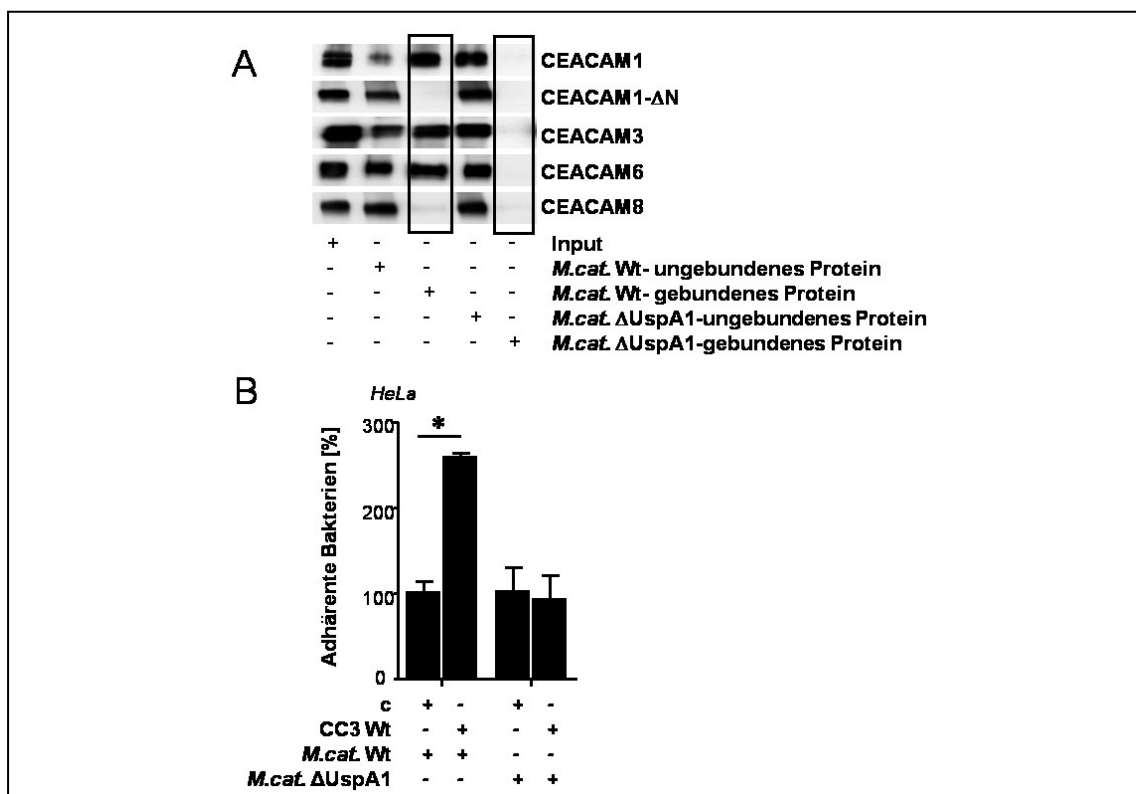


Abb. 10 Bindung von *M. catarrhalis* UspA1 an CEACAM. (A) Pulldown-Assay: BBH18 Wildtyp-Bakterien und die UspA1-defiziente Mutante BBH18.1 wurden, wie im Methodenteil beschrieben, mit rekombinanten CEACAM Proteinen inkubiert. Anschließend wurden 10% des Inputs, 10% der Überstände (ungebundene Proteine) und 50% der Eluate (gebundene Proteine) im Westernblot analysiert. (B) CFU-basierter Adhäsionsassay: stabil CEACAM3 (CC3 wt)-oder Kontrollvektor (c) -transfizierte HeLa Zellen wurden mit *M. catarrhalis* Wildtyp bzw. der UspA1-defizienten Mutante (MOI 10) für 1h inkubiert. Die Daten zeigen einen Westernblot aus drei unabhängigen Experimenten (A) bzw. stehen für Mittelwert und Standardabweichung von drei unabhängigen Experimente (B). * $p < 0,05$

In einem weiteren Experiment wurde unter Verwendung eines CFU-basierten Adhäsionsassays die Bindung von *M. catarrhalis* Wildtyp und der UspA1-Deletionsmutante an stabil CEACAM3-exprimierende HeLa Zellen im Vergleich zu Leervektor-transfizierten Zellen untersucht. Auch hier zeigte sich eine signifikant höhere Adhäsion des Wildtyps an die CEACAM3-exprimierenden Zellen (Abb. 10 B).

Zusätzlich wurden freundlicherweise von Kristian Riesbeck Sequenzanalysen zur Verfügung gestellt (Anhang 1), die beweisen, dass das in dieser Studie verwendete UspA1 Protein von *M. catarrhalis* BBH18 die komplette CEACAM-Bindungsregion aufweist, welche bereits von Brooks et al. beschrieben wurde (Brooks, Sedillo et al. 2008).

7.2.2 Oxidativer Burst und Degranulation humaner Granulozyten nach Interaktion von *Moraxella catarrhalis* UspA1 und CEACAM3

Die Aktivierung von humanen Granulozyten zeigt sich unter anderem in der Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies, dem oxidativem Burst, und in der Degranulation und damit verbundenen Ausschüttung von Myeloperoxidase (MPO). Die granulozytäre Produktion reaktiver Sauerstoffspezies wurde unter Verwendung eines Durchflusszytometrie-basierten Protokolls bestimmt. Dabei wurde die Oxidation des nicht-fluoreszierenden 2', 7'-Dichlorodihydrofluoreszein Diacetat (DCFH-DA) zum hoch-fluoreszierendem 2', 7'-Dichlorofluoreszein (DCF) gemessen (Abb. 11 A). Es zeigte sich, dass der *Moraxella* UspA1-CEACAM3 Interaktion eine bedeutende Rolle bei der Freisetzung der reaktiven Sauerstoffspezies zukommt. Sowohl die Inhibition dieser Interaktion durch Verwendung des CEACAM3-blockenden Antikörpers [Col-1] (Chen and Gotschlich 1996), als auch die Infektion der Granulozyten mit der UspA1-Deletionsmutante von *M. catarrhalis*, die nicht in der Lage ist CEACAM3 zu binden, resultierten in einer signifikant verringerten Produktion reaktiver Sauerstoffspezies und somit deutlich geringeren Umsetzung von DCFH-DA zu DCF. Die Degranulation der Myeloperoxidase hängt ebenfalls von der UspA1-CEACAM3 Interaktion ab. Das Abblocken der Bindung durch den CEACAM3-blockenden Antikörper [Col-1], und auch die Verwendung der UspA1-Deletionsmutante führten zu einer signifikant geringeren MPO Freisetzung in den Zellkulturüberstand, während das Abblocken von CEACAM1 und CEACAM6 mit den entsprechenden Antikörpern keinen negativen Einfluss hatte (Abb. 11 B).

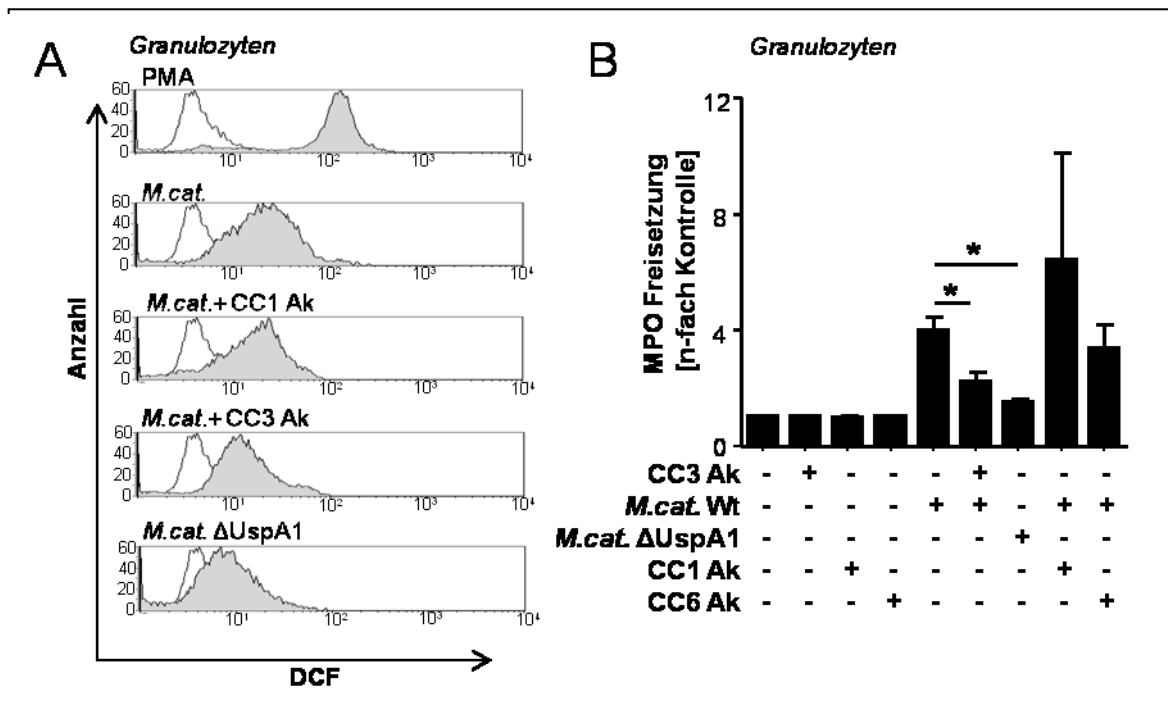


Abb. 11 CEACAM3 spezifische Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies und Degranulation. (A) Nachweis der Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies durch Messung der Dichlorofluoreszein (DCF)-abhängigen Fluoreszenz von Granulozyten nach einstündiger Inkubation mit *M. catarrhalis* Wildtyp bzw. der UspA1-defizienten Mutante (MOI 100) mit oder ohne Vorinkubation (1h, 30µg/ml) mit dem CEACAM3-blockenden Antikörper [Col-1] bzw. einem CEACAM1-blockenden Antikörper. PMA diente als Positivkontrolle, unstimulierte Zellen wurden als Negativkontrolle verwendet (nicht gefüllte Kurven). (B) Zum Nachweis der *Moraxella* induzierten Degranulation wurden Granulozyten mit Cytochalasin B vorbehandelt, gefolgt von einer einstündigen Infektion mit *M. catarrhalis* Wildtyp bzw. der UspA1-defizienten Mutante (MOI 50) mit oder ohne Vorinkubation (1h, 30µg/ml) mit dem CEACAM3-blockenden Antikörper [Col-1] bzw. einem CEACAM1- oder CEACAM6-blockendem Antikörper. Die Zellkulturüberstände wurden auf Myeloperoxidase-Freisetzung untersucht. Die unbehandelte Kontrollprobe wurde 100% gesetzt. Die Durchflusszytometrie Histogramme zeigen ein Experiment repräsentativ für drei unabhängige Experimente (A), das Balkendiagramm zeigt Mittelwert und Standardabweichung von 3 unabhängigen Experimenten (B). * $p < 0,05$

7.2.3 Die Sekretion von Chemokinen und die Interaktion von *Moraxella* UspA1 und CEACAM3

Um den funktionellen Effekt der *M. catarrhalis* UspA1-CEACAM3 Interaktion weiter zu untersuchen, wurde die *Moraxella*-induzierte Freisetzung zweier Chemokine mittels ELISA im Zellkulturüberstand gemessen. Dafür wurden primäre humane Granulozyten mit dem *M. catarrhalis* Stamm BBH18 (MOI 50) für 16 h inkubiert. Der TLR2 Agonist Pam₃Cys diente als Positivkontrolle. Um den Einfluss von CEACAM3 sichtbar zu machen, wurde der CEACAM3 blockende Antikörper [Col-1] verwendet, ein entsprechen-

der IgG Isotypenantikörper, sowie ein CEACAM1- und ein CEACAM6-blockender Antikörper wurden zur Kontrolle eingesetzt. Abb. 12 A zeigt, dass humane Granulozyten, die mit dem CEACAM3-blockenden Antikörper vorinkubiert wurden, eine signifikant geringere CXCL8 Sekretion nach Bakterienstimulation vorweisen, im Vergleich zu Zellen ohne CEACAM3 Antikörpervorinkubation. Wohingegen der proinflammatorische Effekt, der auf der *Moraxella*–CEACAM3 Interaktion beruht, nicht durch die Anwesenheit anderer CEACAM Antikörper oder des IgG Kontrollantikörpers beeinflusst wurde. Erwartungsgemäß führte das Abblocken von CEACAM 3 nicht zu einer reduzierten CXCL8 Freisetzung nach Infektion humaner Granulozyten mit der UspA1-Deletionsmutante. (Abb. 12 B). Zusätzlich konnte für das Granulozyten-aktivierende Chemokin CCL3 (Mip-1 α) eine CEACAM3-abhängige Sekretion nachgewiesen werden. Das Abblocken von CEACAM3 im Vorfeld der *M. catarrhalis* Infektion führte auch hier zu einer verminderten CCL3 Konzentration im Zellkulturüberstand (Abb. 12 C).

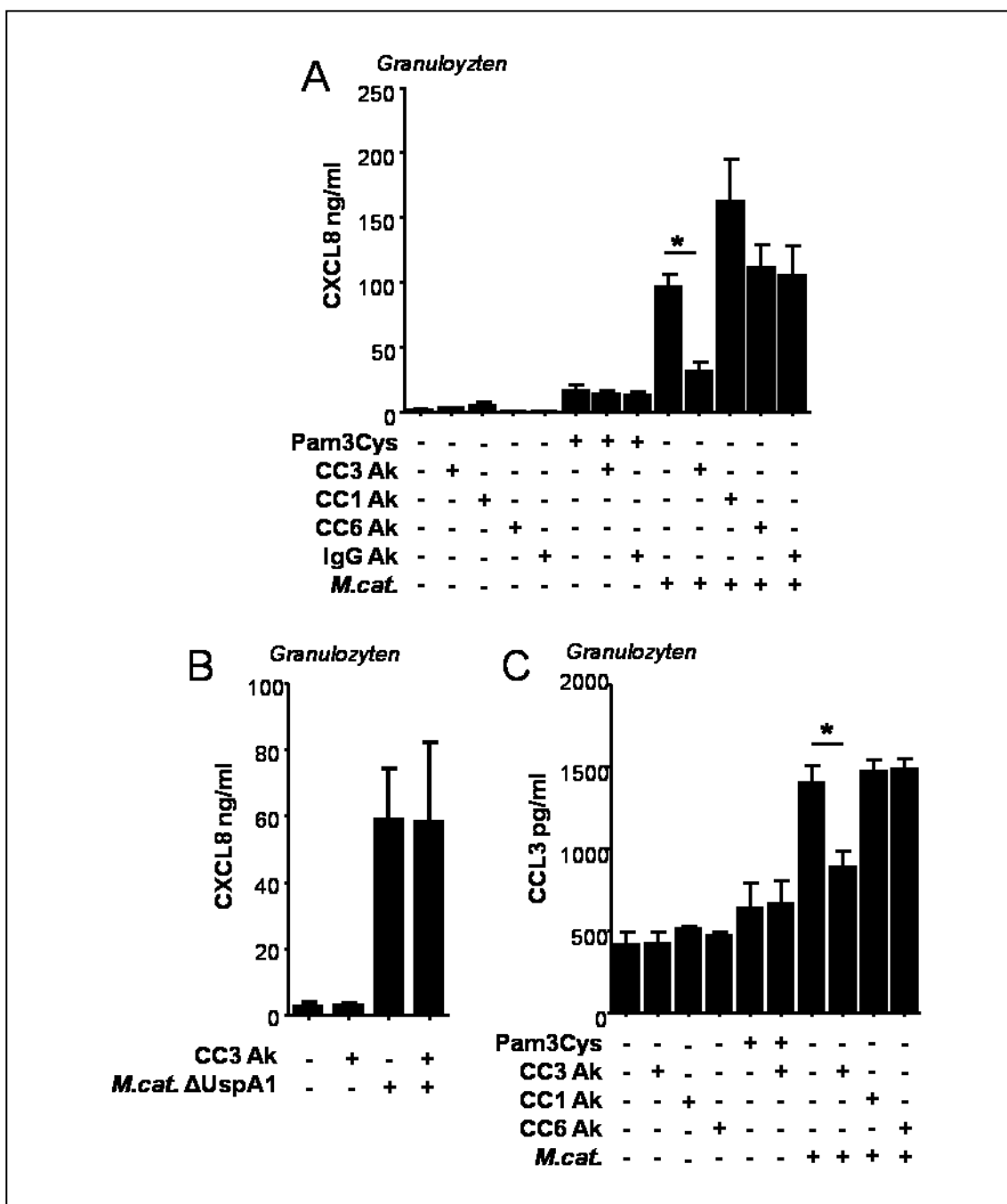


Abb. 12 *Moraxella catarrhalis* induzierte Freisetzung von Chemokinen. (A, B) CXCL8 und (C) CCL3 Sekretion bestimmt mittels ELISA in Überständen von Granulozyten stimuliert für 16 h mit Pam₃Cys (1µg/ml), *M. catarrhalis* Stamm BBH18 bzw. (B) *M. catarrhalis* UspA1 Deletionsmutante (je MOI 50) mit oder ohne Vorinkubation (1h, 30µg/ml) mit dem CEACAM3-blockenden Antikörper [Col-1], bzw. einem CEACAM1- oder CEACAM6-blockenden Antikörper, sowie (A) einer IgG-Isotypkontrolle. Die Daten zeigen Mittelwert und Standardabweichung von mindestens drei unabhängigen Experimenten. * p<0,05

7.2.4 Die Bedeutung des CEACAM3 ITAM für die *Moraxella* UspA1-induzierte CXCL8 Sekretion in NB4 Zellen

Primäre humane Granulozyten eignen sich aufgrund ihrer kurzen Lebensspanne nicht für zeitintensive Versuche, wie zum Beispiel RNA Interferenz Experimente. Für weiterführende Untersuchungen, zum Mechanismus der *Moraxella*-induzierten CEACAM3-abhängigen Zytokin Sekretion, wurde die promyelozytische Zelllinie NB4 verwendet (Abb.13)

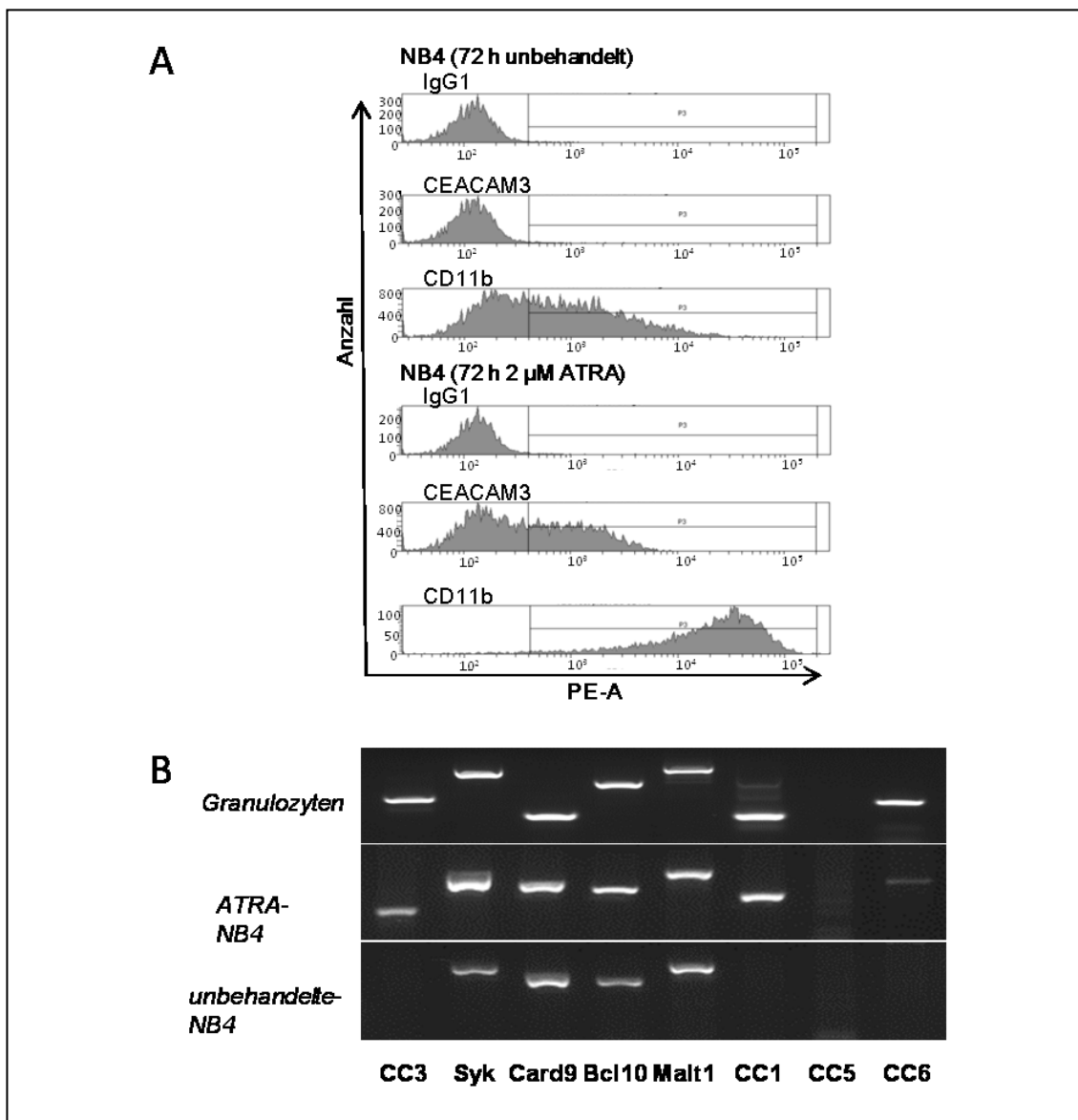


Abb. 13 Differenzierung von NB4 Zellen mittels ATRA. (A) Durchflusszytometrie Daten der CEACAM3 und CD11b Oberflächenexpression uninduzierter und für 72 h mit ATRA differenzierter NB4 Zellen. Maus-IgG1 Antikörper wurde als Isotypkontrolle eingesetzt. (B) RT-PCR Vergleich Granulozyten, 72 h ATRA-differenzierte NB4 Zellen und uninduzierte NB4 Zellen. Die Daten repräsentieren ein Experiment aus drei unabhängigen Experimenten.

Wie in Abb. 13 A mittels Durchflusszytometrie gezeigt, exprimieren unbehandelte NB4 Zellen kein CEACAM3, wohingegen eine 72 stündige Inkubation in Medium mit 2 μ M all-trans Retinolsäure (ATRA) zu einer Zelldifferenzierung, gekennzeichnet durch *de novo* CEACAM3 Synthese und verstärkte CD11b Expression, führt. RT-PCR Analysen beweisen, dass sowohl undifferenzierte und differenzierte NB4 Zellen, als auch humane Granulozyten, die Hauptproteine des untersuchten Signalwegs, Syk Kinase, Card9, Bcl10 sowie Malt1, bilden (Abb. 13 B). Zusätzlich konnte T. Jacobi in seiner Dissertation zeigen, dass CEACAM1, 6 und 8 auf der Zelloberfläche ATRA-differenzierter, nicht aber auf undifferenzierten NB4 Zellen nachweisbar sind (Jacobi, 2008). Da diese Rezeptoren nicht in die Induktion des proinflammatorischen ITAM/Syk/Card9- abhängigen Signalwegs involviert sind, sind sowohl ATRA-differenzierte, als auch undifferenzierte NB4 Zellen für die Erforschung ITAM-abhängiger Signalwege geeignet (Gray-Owen and Blumberg 2006, Kuespert, Pils et al. 2006).

Um den Einfluss von CEACAM3 auf die CXCL8 Produktion zu untersuchen, wurde CEACAM3 mittels siRNA in ATRA-differenzierten NB4 Zellen herunterreguliert. Die Knockdowneffizienz wurde im Durchflusszytometer gemessen (Abb. 14 A). Anschließend wurden die Zellen für 16 Stunden mit *M. catarrhalis* inkubiert. Wie in Abbildung 14 A zu sehen, ist im Vergleich zur unspezifischen Kontroll-siRNA, die CXCL8 Sekretion signifikant vermindert. In einem weiteren Experiment wurden undifferenzierte NB4-Zellen transient mit einem Kontrollvektor bzw. mit einem CEACAM3 Plasmid transfiziert und mit BBH18 Wildtyp bzw. der UspA1 Deletionsmutante für 16 Stunden infiziert. Im Vergleich zum Wildtyp induzierte der UspA1-defiziente Stamm eine signifikant reduzierte Freisetzung von CXCL8 in den Zellkulturüberstand (Abb. 14 B).

Um die Bedeutung der CEACAM3 ITAM-like Domäne für die *Moraxella*-induzierte Chemokinsekretion zu klären, wurden CEACAM3 Tyrosin-Mutanten verwendet, deren Tyrosinreste 230 bzw. 241 durch Phenylalanin ersetzt wurden (Y230F, Y240F). Transient transfizierte undifferenzierte NB4 Zellen wurden für 16 h mit *M. catarrhalis* Wildtyp inkubiert. Nur CEACAM3 – exprimierende Zellen zeigten eine signifikant höhere CXCL8 Produktion im Vergleich zu Kontrollvektor-transfizierten Zellen. Die Expression der CEACAM3 ITAM Mutanten führte zu keiner Änderung in der Zytokinsekretion (Abb. 14 C). Durchflusszytometrieanalysen zeigten keinen Unterschied in der Expressionsintensität von CEACAM3 Wildtyp und Mutanten (Abb. 14 D).

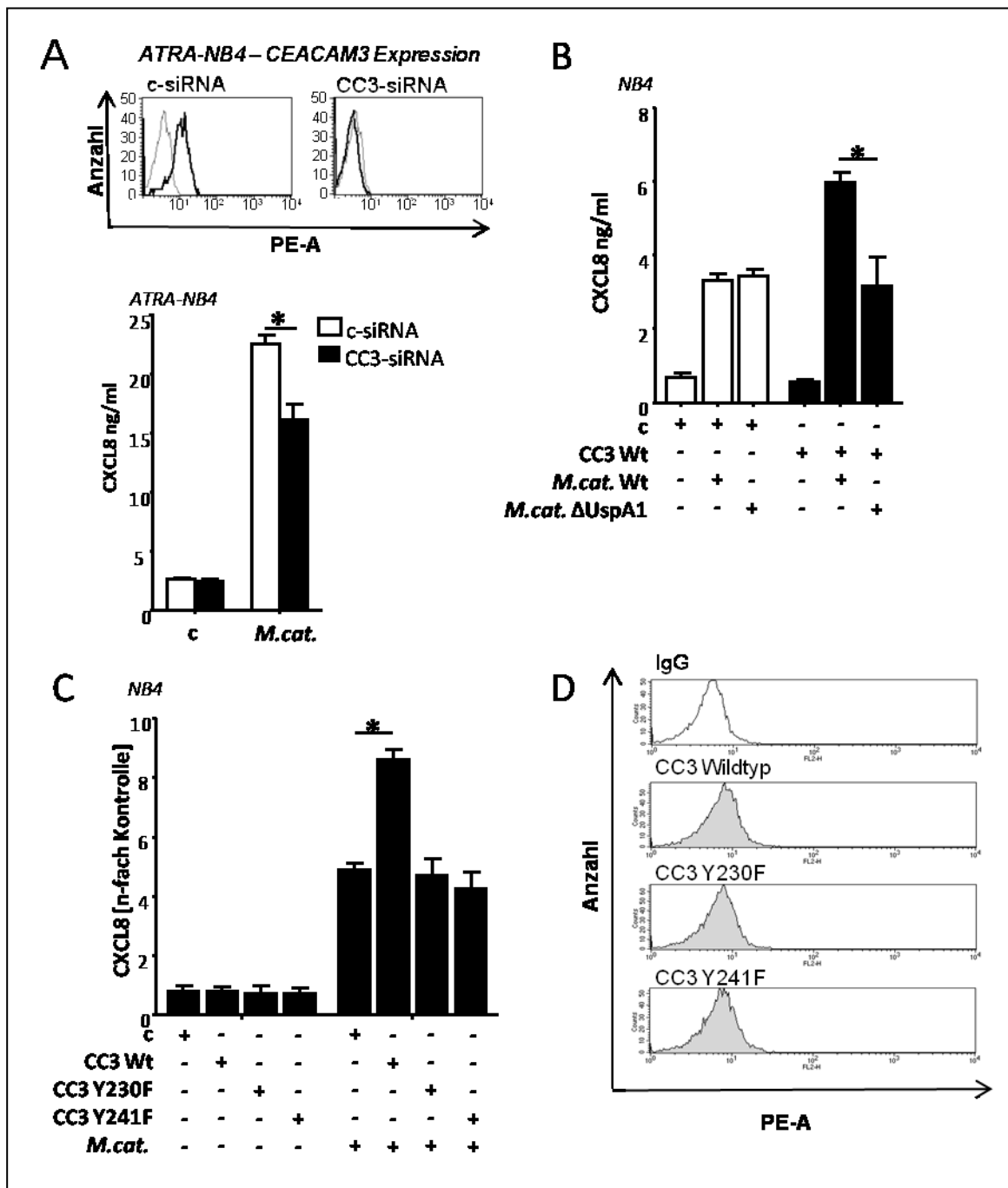


Abb. 14 Die Bedeutung von CEACAM3 ITAM für die *M. catarrhalis* UspA1 induzierte CXCL8 Sekretion (A) Durchflusszytometrie Daten der CEACAM3-siRNA Knockdowneffizienz (graue Linie: Isotypkontrolle, schwarze Linie CEACAM3 Antikörper) und CXCL8 ELISA aus Überständen ATRA-differenzierter NB4 Zellen, transfiziert für 96 h mit Kontroll- (csi) bzw. CEACAM3-siRNA (CC3-si) und anschließend infiziert für 16 h mit *M. catarrhalis* BBH18 (MOI 50). (B) CXCL8 ELISA aus Überständen undifferenzierter NB4 Zellen, transient transfiziert mit Kontrollvektor (c) oder CEACAM3 Wildtyp (CC3 Wt) und anschließender Inkubation für 16 h mit *M. catarrhalis* BBH18 (MOI 50) bzw. *M. catarrhalis* UspA1 Deletionsmutante BBH18.1 (MOI 50). (C) CXCL8 ELISA aus Überständen undifferenzierter NB4 Zellen, transient transfiziert mit Kontrollvektor (c), CEACAM3 Wildtyp (CC3 Wt), CEACAM3 Y230F bzw. CEACAM3 Y241F und anschließender Inkubation für 16 h mit *M. catarrhalis* BBH18 (MOI 50). Nicht infizierte Kontrollvektor-transfizierte Zellen wurden 1 gesetzt (Spannbreite: 246-1323 pg/ml).

(D) Durchflusszytometrie Daten der CEACAM3 Expression auf NB4 Zellen transfiziert für 24 h mit CEACAM3 Wildtyp, Y230F und Y241F. Die Daten sind repräsentativ für ein Experiment aus drei Experimenten (A, D) oder zeigen Mittelwert und Standardabweichung von mindestens drei unabhängigen Experimenten. * $p < 0,05$

Zusammengenommen zeigen die Daten, dass die Interaktion von UspA1 mit CEACAM3 die *M. catarrhalis*-induzierte inflammatorische Immunantwort humaner Granulozyten verstärkt. Die phosphorylierbaren Tyrosinreste innerhalb des ITAM-artigen Motivs von CEACAM3 spielen dabei eine entscheidende Rolle.

7.3 Untersuchung der beteiligten Signalwege der *Moraxella* UspA1-CEACAM3-induzierten CXCL8 Sekretion

7.3.1 Die Bedeutung der NF- κ B-Aktivierung für die *Moraxella catarrhalis* induzierte CEACAM3-Signalkaskade

Die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B ist ein bedeutender Schritt für die Erreger-induzierte proinflammatorische Immunabwehr. Mit Hilfe der Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP) wurde die *Moraxella*-induzierte CEACAM3-abhängige Bindung der verschiedenen NF- κ B Untereinheiten, sowie die Rekrutierung der Polymerase II an den CXCL8 Promotor humaner Granulozyten analysiert. Dafür wurden primäre humane Granulozyten eine Stunde mit *Moraxella catarrhalis* stimuliert. Die CEACAM3 Abhängigkeit wurde durch Vorinkubation mit dem CEACAM3-abblockenden Antikörpers [Col-1] getestet. Zur Kontrolle und zum Ausschluss unspezifischer Effekte wurde ein CEACAM1-spezifischer Antikörper verwendet. Anschließend wurden mit Hilfe spezifischer Antikörper p65 und c-Rel als Indikatoren für die NF- κ B Aktivierung und Polymerase II als Anzeiger für die CXCL8 Gentranskription präzipitiert. Abb. 15 zeigt, dass die Vorinkubation der Granulozyten mit dem CEACAM3-abblockenden Antikörper [Col-1], die *M. catarrhalis* induzierte Bindung der Transkriptionsfaktoren p65 und c-Rel, sowie die Rekrutierung der Polymerase inhibiert. Dieser inhibierende Effekt konnte nicht bei der Verwendung des CEACAM1-abblockenden Antikörpers beobachtet werden.

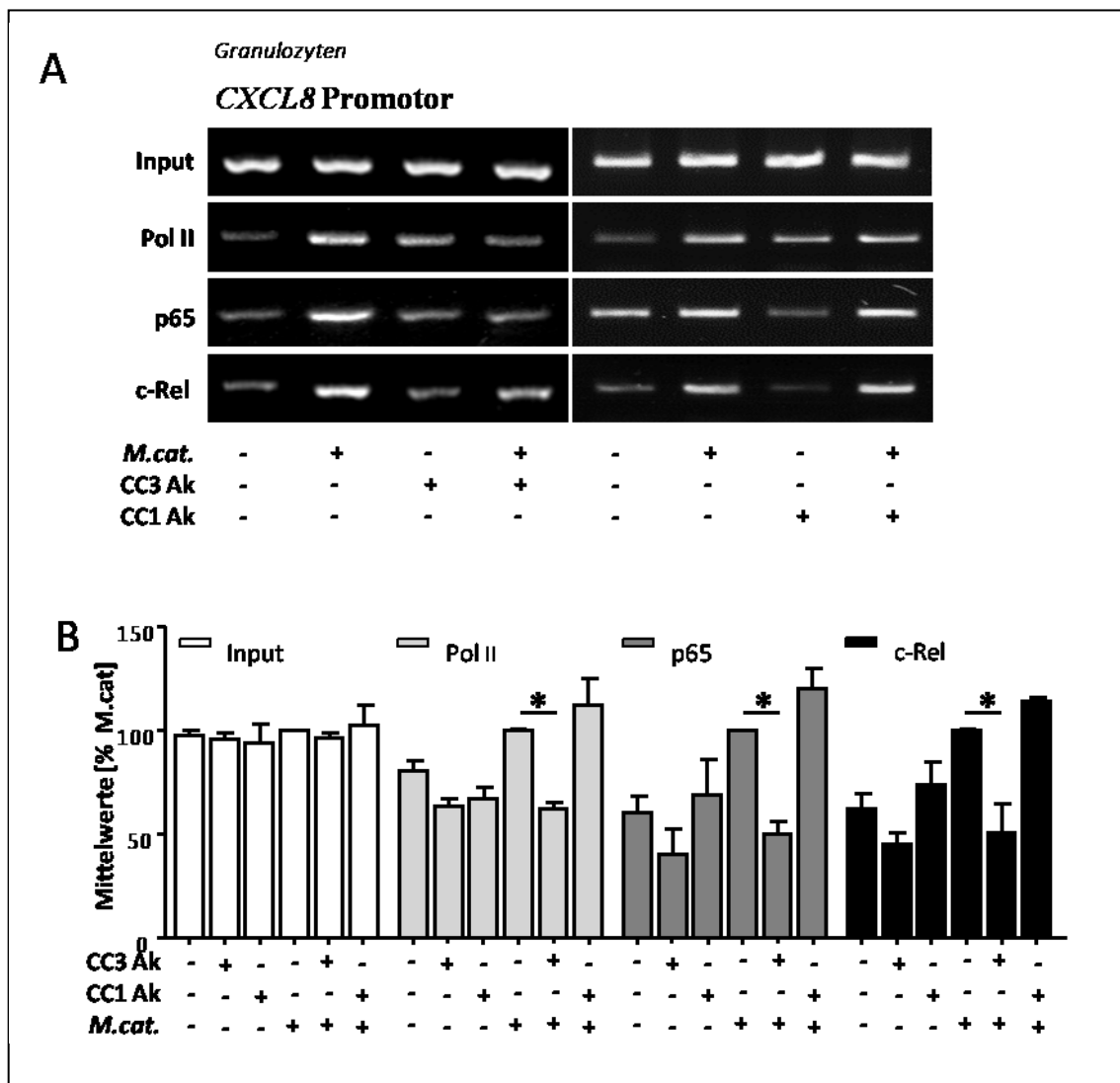


Abb. 15 ChIP der *M. catarrhalis* induzierten Rekrutierung von NF- κ B an die *CXCL8* Promotorregion. (A) Humane Granulozyten wurden für 1 h mit *M. catarrhalis* BBH18 stimuliert mit und ohne Vorinkubation (1h, 30 μ g/ml) mit dem CEACAM3-blockenden Antikörper [Col-1] oder einem CEACAM1-blockenden Antikörper. Die Rekrutierung von c-Rel, p65 und Pol II an den *CXCL8* Promoter wurde mittels PCR nach Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP) nachgewiesen. (B) Die PCR Gele wurden gescannt und quantifiziert. Die Daten sind repräsentativ für ein Experiment aus drei Experimenten (A, D) oder zeigen Mittelwert und Standardabweichung von mindestens drei unabhängigen Experimenten. * $p < 0,05$

7.3.2 Die Bedeutung der Syk Kinase für die *Moraxella* UspA1-CEACAM3-induzierte *CXCL8* Sekretion

Für *Neisseria gonorrhoe* ist bekannt, dass die Bindung Opa-exprimierender Neisserien an CEACAM3 zu einer Phosphorylierung der Tyrosinreste in der ITAM Domäne führt. Darauf folgt die Rekrutierung der Syk Kinase an die ITAM Domäne und die Syk-Phosphorylierung (Sarantis and Gray-Owen 2007). In dieser Arbeit wurde untersucht,

inwiefern der gleiche Mechanismus von *M. catarrhalis* induziert werden kann. Mittels Koimmunpräzipitation konnte im Western Blot eine direkte CEACAM3-Syk Interaktion in ATRA-differenzierten NB4 Zellen nachgewiesen werden (Abb. 16 A). Zusätzlich zeigten Durchflusszytometrie-Experimente, dass eine zwei- bzw. fünfminütige Inkubation humaner primärer Granulozyten mit *M. catarrhalis* zu einem signifikanten Anstieg von phosphoryliertem Syk führt, während die totale Menge an Syk in den Zellen unbeeinflusst bleibt (Abb. 16 B). Um die funktionelle Bedeutung der Syk-Phosphorylierung zu testen, wurden humane primäre Granulozyten mit *M. catarrhalis* mit und ohne Vorinkubation mit dem Syk Kinase Inhibitor R406 infiziert. Die Inhibition der Syk Kinase resultierte in einer signifikant verminderten CXCL8 Sekretion (Abb. 16 C). Zusätzlich wurden ATRA-differenzierte NB4 Zellen mit Syk-spezifischer siRNA oder nicht zielgerichteter control siRNA transfiziert. Die Knockdowneffizienz wurde im Western Blot bestätigt. Eine anschließende Infektion der Syk-spezifisch siRNA transfizierten Zellen führte zu einer signifikant geringeren CXCL8 Produktion im Vergleich zu Kontroll-siRNA transfizierten Zellen (Abb. 16 D).

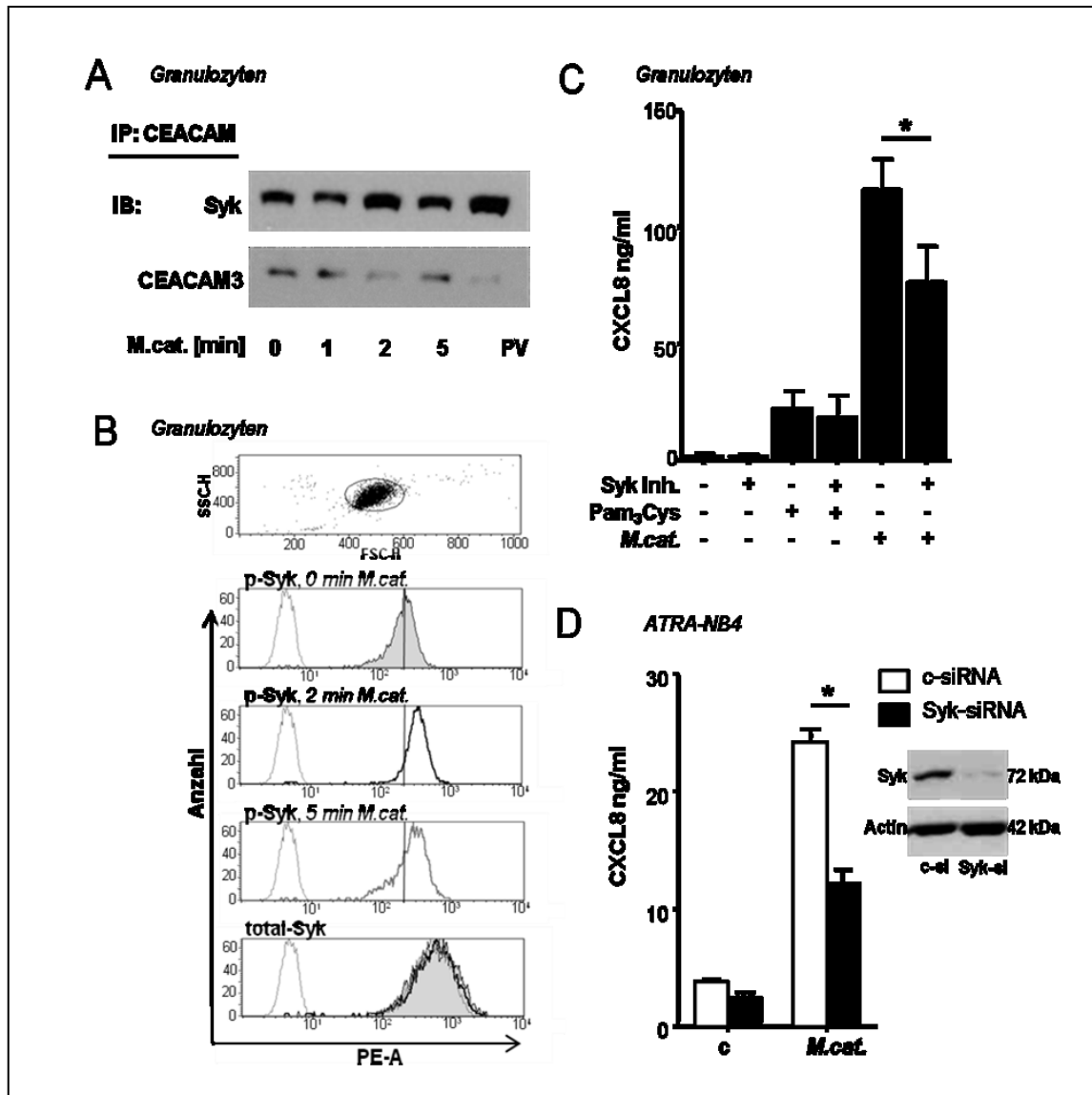


Abb. 16 Die Bedeutung der Syk Kinase für die CXCL8 Induktion. (A) Westernblot Analyse der CEACAM3-Syk Koimmunpräzipitation. Syk und CEACAM3 wurden in den Lysaten ATRA-differenzierter NB4 Zellen gemessen, nach Inkubation mit *M. catarrhalis* (MOI 50) und Immunpräzipitation von CEACAM. (B) Durchflusszytometrie Daten der Expression von Total-Syk und phosphoryliertem Syk in humanen Granulozyten unstimuliert (gefülltes Histogramm) oder stimuliert mit *M. catarrhalis* MOI 50 für zwei Minuten (schwarze Linie) bzw. fünf Minuten (graue Linie). Isotypkontrolle (gepunktete Linie). (C) CXCL8 ELISA mit Überständen von Granulozyten unbehandelt oder inkubiert für 16 h mit BBH18 (MOI 50) mit oder ohne Vorinkubation (1h, 1 μ M) mit dem Syk Kinase Inhibitor R406. (D) Westernblot Analyse der Syk-siRNA Knockdowneffizienz in ATRA-differenzierten NB4 Zellen nach 72 h Transfektion mit Kontroll-siRNA (csi) oder Syk-spezifischer siRNA (Syk-si) und CXCL8 ELISA mit Überständen von ATRA-differenzierten NB4 Zellen transfiziert für 72 h mit Kontroll-siRNA oder Syk-siRNA und anschließend infiziert mit *M. catarrhalis* (MOI 50, 16 h). Die Daten sind repräsentativ für ein Experiment aus drei Experimenten (A, B, D) oder zeigen Mittelwert und Standardabweichung von mindestens drei unabhängigen Experimenten. * $p < 0,05$

7.3.3 Die Bedeutung des Card9/Bcl10/Malt1 Signalosoms für die *Moraxella* UspA1-CEACAM3-induzierte Aktivierung von NF- κ B

In der Vergangenheit wurde gezeigt, dass der hemITAM-tragende Rezeptor Dectin-1 in der Lage ist, über den Syk und Card9 Signalweg, NF- κ B und somit auch die CXCL8 Expression zu aktivieren (Gross, Gewies et al. 2006). Daraufhin, wurde in dieser Arbeit der Einfluss von Card9 auf die *Moraxella*-induzierte CEACAM3-abhängige CXCL8 Sekretion näher untersucht. In einem ersten Versuch wurde die Card9 Expression in ATRA-differenzierten NB4 Zellen durch Transfektion Card9-spezifischer siRNA gesenkt. Die Herunterregulation von Card9 wurde per qPCR nachgewiesen und führte zu einer signifikant reduzierten *Moraxella*-induzierten CXCL8 Sekretion im Vergleich zu Kontroll-siRNA transfizierten Zellen (Abb 17 A, B). Um die Verbindung von CEACAM3 mit dem Card9-abhängigen Signalweg noch deutlicher zu beweisen, wurde ein NF- κ B Reportergentest, wie bei Gross et al. beschrieben, verwendet (Gross, Gewies et al. 2006). HEK293 Zellen wurden transient mit einem NF- κ B Luziferase Reporterplasmid, sowie mit einem Leervektor oder CEACAM3-, bzw. Card9-/Bcl10-kodierenden Expressionsplasmiden kotransfiziert. Die Kotransfektion mit CEACAM3 oder dem leeren Kontrollvektor führte zu keiner Aktivierung des Reportergens. In diesen Zellen kam es auch nach einer Infektion mit *M. catarrhalis* nicht zu einer NF- κ B-Induktion. Wie bereits bei Gross et al. beschrieben zeigten HEK293 Zellen, die nur mit dem Card9- und dem Bcl10- kodierendem Plasmid transfiziert wurden, eine nachweisbare NF- κ B Aktivierung. Dieses Hintergrundsignal wurde nicht von einer bakteriellen Stimulation beeinflusst. Dagegen zeigten Zellen, die sowohl CEACAM3 also auch Card9 und Bcl10 exprimieren, eine signifikant verstärkte *Moraxella*-induzierte NF- κ B Aktivierung. (Abb. 17 C). Wie erwartet, konnte keine Induktion des NF- κ B in HEK293 Zellen nach der Kotransfektion von Card9-, Bcl10- Expressionplasmiden und den CEACAM3 ITAM Tyrosin Mutanten-kodierenden Plasmiden nachgewiesen werden.

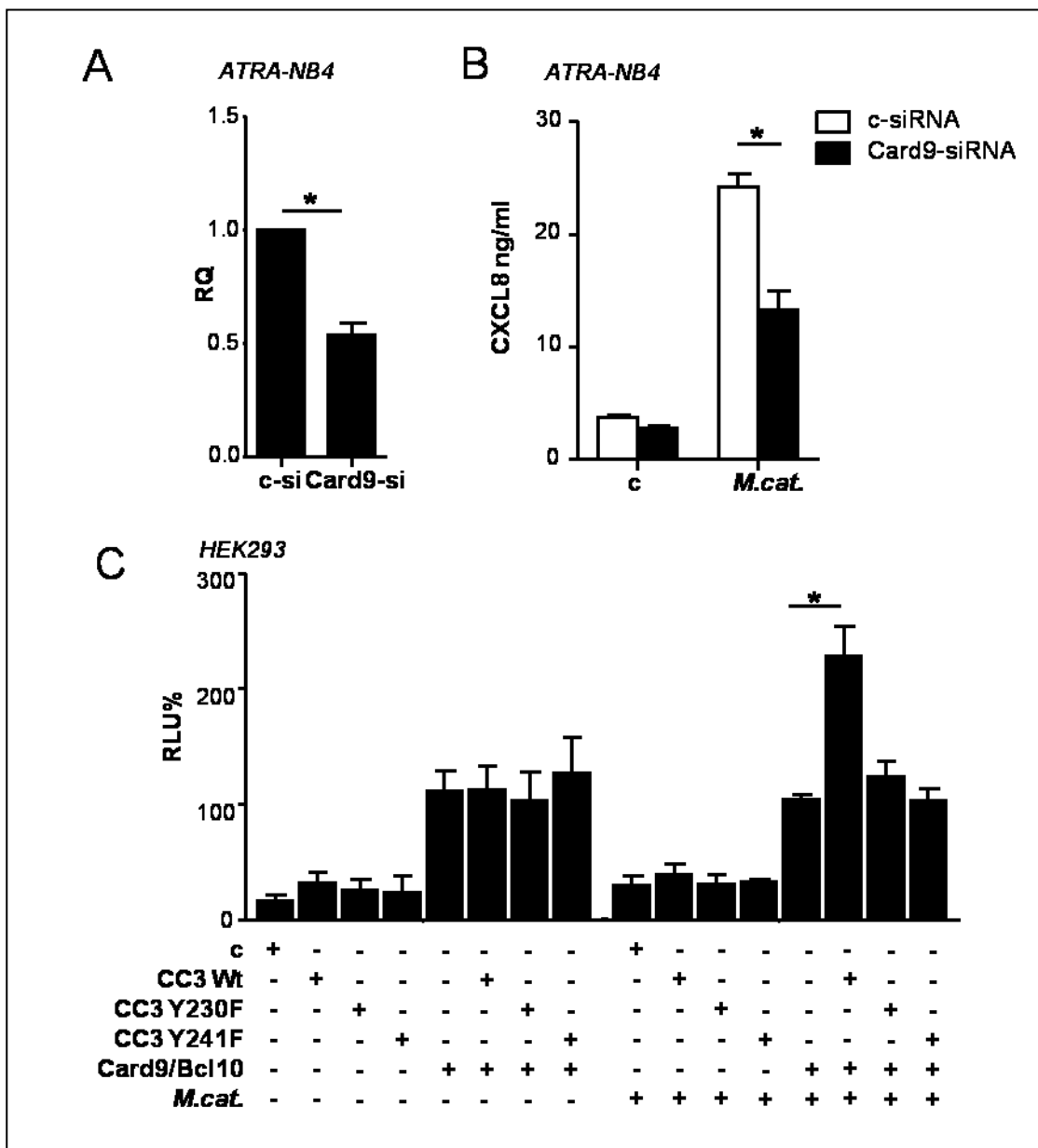


Abb. 17 Die Bedeutung von Card9 für die CXCL8 Induktion. (A) qPCR Analyse der Card9-siRNA Knockdowneffizienz in ATRA-differenzierten NB4 Zellen nach 72 h Transfektion mit Kontroll-siRNA (csi) oder Card9-spezifischer siRNA (Card9-si). (B) CXCL8 ELISA mit Überständen von ATRA-differenzierten NB4 Zellen transfiziert für 72 h mit Kontroll-siRNA oder Card9-siRNA und anschließend infiziert mit *M. catarrhalis* (MOI 50, 16 h). (C) Luziferaseaktivität in HEK293 Zellen transient kotransfiziert mit Card9/Bcl10 und CEACAM3 Wildtyp, CEACAM3 Y230F, CEACAM3 Y241F bzw. Kontrollvektor. Die Daten sind repräsentativ für ein Experiment aus drei Experimenten (A, B, D) oder zeigen Mittelwert und Standardabweichung von mindestens drei unabhängigen Experimenten. * $p < 0,05$

8 Diskussion

8.1 Die Interaktion von *Moraxella catarrhalis* mit humanen Granulozyten

In der Vergangenheit wurde mehrfach gezeigt, dass *M. catarrhalis* an der Zelloberfläche pulmonarer Epithelzellen mehrzellige, traubenförmige Aggregate bildet und mit verschiedenen Zelloberflächenrezeptoren interagiert (Aebi, Lafontaine et al. 1998, Hill and Virji 2003, Gray-Owen and Blumberg 2006, Slevogt, Tiwari et al. 2006, Slevogt, Seybold et al. 2007, Slevogt, Zabel et al. 2008). Diese Aggregatbildung konnte im Rahmen dieser Doktorarbeit auch auf humanen Granulozyten demonstriert werden. Zusätzlich deuten lamellipodienartige Membranaustülpungen auf eine CEACAM3-abhängige Aufnahme in die Zellen hin, wie sie bereits von Billker et al. und Buntru et al. für die Aufnahme von *Neisseria gonorrhoeae* durch CEACAM3-exprimierende HeLa Zellen und primäre humane Granulozyten beschrieben wurde (Billker, Popp et al. 2002, Buntru, Roth et al. 2012).

Die meisten Studien über CEACAM3 beschäftigen sich mit der Opsonin-unabhängigen Phagozytose bakterieller Erreger. Dabei liegt der Fokus primär auf der Interaktion zwischen *colony opacity-associated* (Opa)-exprimierenden *N. gonorrhoeae* und humanen Granulozyten (Chen and Gotschlich 1996, Schmitter, Agerer et al. 2004, Sarantis and Gray-Owen 2007, Pils, Kopp et al. 2012, Sarantis and Gray-Owen 2012). Schmitter et al. (2004) haben nachgewiesen, dass neben *N. gonorrhoeae* und *H. influenzae* auch *M. catarrhalis* über CEACAM3 erkannt und phagozytiert wird. Diese Doktorarbeit zeigt ebenfalls, dass Moraxellen durch Granulozyten internalisiert werden. Die Auszählung der durchschnittlich aufgenommenen Bakterien pro Granulozyt, mit und ohne Verwendung eines CEACAM3-blockenden Antikörpers, lieferte trotz des Auftretens von lamellipodienartigen Membranausstülpungen keine Hinweise auf eine CEACAM3-Abhängigkeit. Ursache hierfür könnte die verwendete Inkubationszeit sein, u.U. wären kürzere Inkubationszeiten aussagekräftiger, auch die verwendete Methode des einfachen Auszählens ist fehleranfälliger. Zum Vergleich, Schmitter et al. verwendeten Durchflusszytometrieanalysen um die Phagozytose von *N. gonorrhoeae* nach 20 minütiger Inkubation nachzuweisen (Schmitter, Agerer et al. 2004).

Unabhängig davon, kann aufgrund der Ergebnisse der Transmissions- bzw. Rasterelektronenmikroskopie, in Kombination mit den FISH Daten, von einer verlängerten Interaktion zwischen biologisch aktiven Moraxellen und granulozytären Oberflächenrezeptoren wie CEACAM3 ausgegangen werden.

Brooks et al. haben über Sequenzanalysen gezeigt, dass es verschiedene *M. catarrhalis* UspA1 Varianten gibt, die sich im CEACAM-bindenden Motiv unterscheiden. Weiterführende Analysen haben dementsprechend Unterschiede in der CEACAM-Bindungsfähigkeit gezeigt (Hill and Virji 2003, Brooks, Sedillo et al. 2008). In der Vergangenheit wurde vielfach das amerikanische Isolat O35E, dessen UspA1 Deletionen in der CEACAM-bindenden Region aufweist, für Studien mit CEACAM1 verwendet. Unabhängig von der Bindungsfähigkeit, wurde nachgewiesen, dass UspA1-abhängig über CEACAM1 sowohl die TLR2 Immunantwort inhibiert, als auch Apoptose induziert wird (N'Guessan, Vigelahn et al. 2007, Slevogt, Zabel et al. 2008). Für die vorliegende Doktorarbeit wurde das europäische *M. catarrhalis* Isolat BBH18 ausgewählt. Die freundlicherweise von Kristian Riesbeck (Universität Lund) zur Verfügung gestellten UspA1-Sequenzanalysen zeigen eine intakte CEACAM-bindende Domäne. Auch die weiteren Adhäsionsassays haben gezeigt, dass der Stamm BBH18 in der Lage ist, über UspA1 u.a. an CEACAM3 zu binden. Zusätzlich zu der Wahl des Bakterienstammes wurde für diese Doktorarbeit ein Zellmodell gewählt, welches möglichst nah an die Eigenschaften humaner Granulozyten herankommt. In früheren Studien fanden neben primären humanen Granulozyten vor allem die Epithelzelllinie HeLa oder die promyelozytische Zelllinie MPRO aus der Maus, Verwendung (Schmitter, Pils et al. 2007, Buntru, Roth et al. 2012, Sarantis and Gray-Owen 2012). Im Gegensatz dazu wurde hier eine humane promyelozytische Zelllinie verwendet.

Wie bereits bekannt und in dieser Arbeit auch nochmals gezeigt, ist *M. catarrhalis* BBH18 UspA1 in der Lage auch an granulozytär exprimiertes CEACAM1 und CEACAM6 zu binden. Um zu beweisen, dass der beschriebene Granulozyten-aktivierende Effekt CEACAM3 abhängig ist, wurden in den Versuchen mit primären humanen Granulozyten neben dem CEACAM3-blockendem Antikörper [Col-1] auch CEACAM1-, bzw. CEACAM6-blockende Antikörper als Kontrolle eingesetzt. Diese zeigen entweder wie beim CEACAM6 keinen, oder wie bei CEACAM1 einen tendenziell gegenteiligen Effekt. Es ist sehr wahrscheinlich, dass in den meisten Fällen die Interaktion von CEACAM1 mit CEACAM-bindenden Pathogenen eine inhibitorische

Rezeptorfunktion aufgrund der ITIM Domäne im zytoplasmatischen Teil des CEACAM1 induziert (Slevogt, Zabel et al. 2008). Zusätzlich wurde im Zellmodell die alleinige aktivierende Wirkung von CEACAM3 durch die Verwendung transient CEACAM3-transfizierter NB4 bzw. HEK293 Zellen, die keine anderen CEACAMs exprimieren, dargestellt.

8.2 Die Bedeutung der *Moraxella* UspA1-CEACAM3 Interaktion für die Aktivierung humaner Granulozyten

In einem ersten Versuchsaufbau konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Interaktion von *M. catarrhalis* UspA1 mit CEACAM3 eine wichtige Rolle bei der Auslösung des oxidativen Bursts, d.h. der Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies, und der Degranulation spielt. Diese Ergebnisse stimmen mit der Beobachtung von Sarantis und Gray-Owen überein, dass die CEACAM3- Bindungsfähigkeit von *N. gonorrhoeae* entscheidend für die Induktion des oxidativen Bursts in infizierten Granulozyten ist. Auch die CEACAM3-abhängige *Neisseria*-induzierte Degranulation wurde untersucht, allerdings wurden dafür keine humanen Granulozyten sondern CEACAM3-exprimierende Mausneutrophile verwendet (Sarantis and Gray-Owen 2012).

Lange Zeit war CEACAM3 fast ausschließlich als phagozytischer Rezeptor bekannt, erst vor kurzem, im Jahr 2014, veröffentlichten Sintsova et al. eine Studie, die CEACAM3 mit der Ausschüttung pro-inflammatorischer Zytokine in Verbindung bringt. Die Interaktion von *N. gonorrhoeae* und CEACAM3 löst einen Syk-, PKC δ - und Tak1-abhängigen Signalweg aus, der zu einer Aktivierung von NF- κ B-abhängigen Transkriptionswegen mit anschließender Produktion proinflammatorischer Zytokine führt. Sowohl die Phagozytose als auch der oxidative Burst sind dabei für die Freisetzung der proinflammatorischen Zytokine nicht essentiell (Sintsova, Sarantis et al. 2014). Für *Moraxella* konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die Interaktion des UspA1 mit CEACAM3 ebenfalls zu einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B führt, gefolgt von einer erhöhten CXCL8 und CCL3 Sekretion. Im Gegensatz zu *Neisseria* ist hier aber ein anderer Signalweg beteiligt. Nachweislich wird die CEACAM3-vermittelte Signalübertragung über das zytoplasmatische ITAM-ähnliche Motiv initiiert, gefolgt von der Rekrutierung der Syk Kinase und der Aktivierung von NF- κ B über den Card9 Signalweg (Abb. 18)

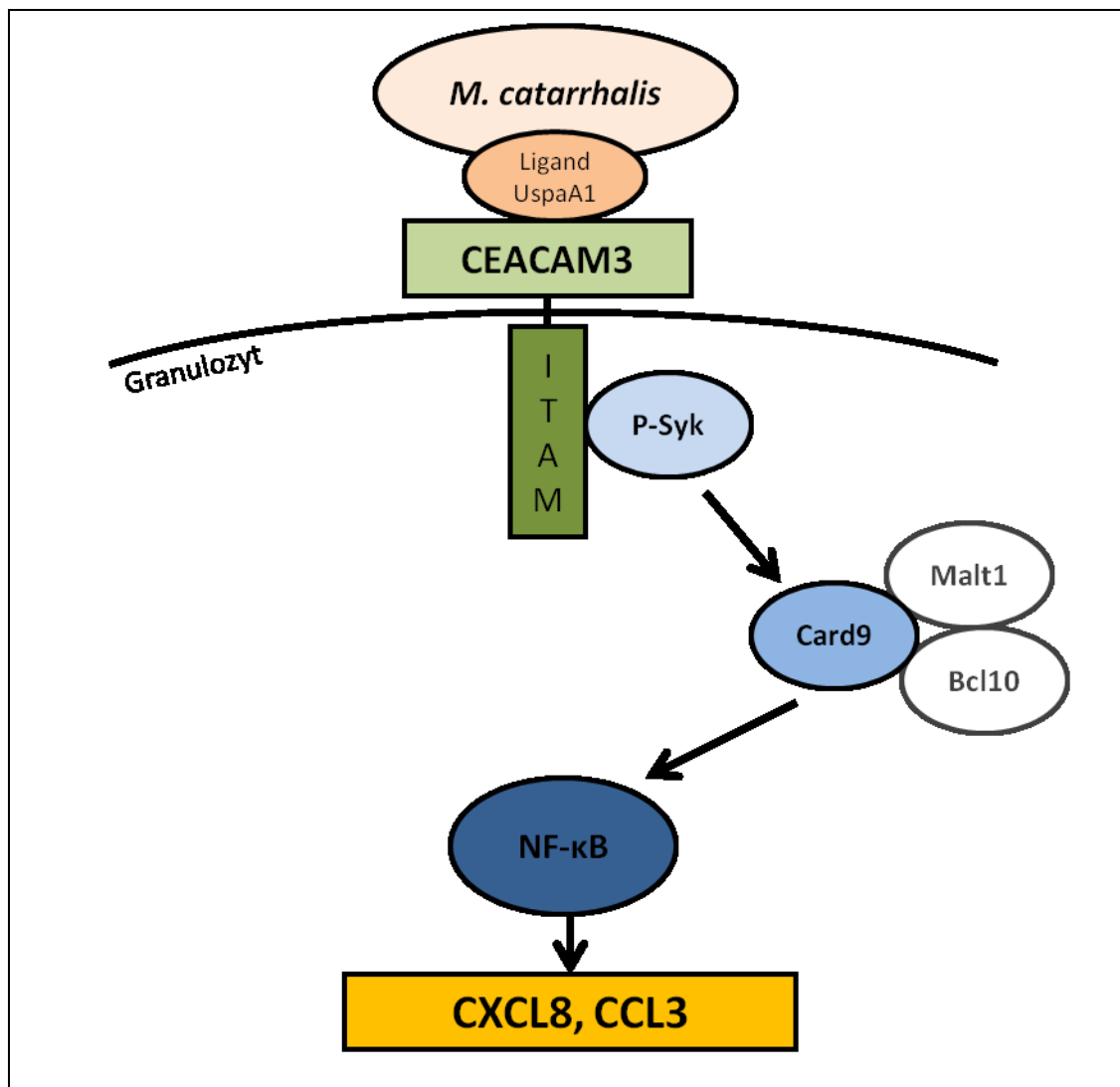


Abb. 18 Schematische Darstellung der CEACAM3-vermittelten Aktivierung des Card9-abhängigen NF-κB Signaltransduktionswegs. Die bakterielle Bindung an CEACAM3 resultiert in einer Rekrutierung und Phosphorylierung von Syk an der zytoplasmatischen ITAM Domäne von CEACAM3, gefolgt von der Aktivierung des Card9/Bcl10/Malt1 Signalosoms, welches zu NF-κB Aktivierung und Zytokinsekretion führt.

Es ist bereits bekannt, dass die Bindung eines Liganden zu einer Phosphorylierung der zytoplasmatischen ITAM Domäne des CEACAM3 durch Src Kinasen führt (McCaw, Schneider et al. 2003, Sarantis and Gray-Owen 2007). Anschließend erfolgt eine direkte Rekrutierung der Syk Kinase an die phosphorylierte ITAM Domäne des CEACAM3, da Syk sowohl nach einer Infektion mit *M. catarrhalis* (diese Arbeit) als auch *N. gonorrhoeae* (Sarantis and Gray-Owen 2012) mit CEACAM3 ko-immunpräzipitiert werden kann. Studien mit ITAM Mutanten haben gezeigt, dass die Substitution eines Tyrosinrestes in der ITAM Domäne, Y230F oder Y241F, die Internalisierung von

Neisserien um 30% mindert, die Doppelmutation Y230F/Y241 zu einer 60% geringeren Aufnahme führt und die Deletion der gesamten zytoplasmatischen Domäne die Internalisierung fast komplett unterbricht (Schmitter, Agerer et al. 2004). Interessanterweise zeigen die Daten in dieser Doktorarbeit, dass bereits die Mutation eines Tyrosinrestes in der ITAM Domäne ausreicht, die CEACAM3-abhängige Zytokinfreisetzung zu unterbinden.

Bereits 2006 wurde von Gross et al. für den ITAM-tragenden Rezeptor Dectin-1 nach Ligandenbindung eine Aktivierung von NF- κ B mit anschließender Zytokinsekretion beschrieben. Es wurde gezeigt, dass diese Zytokinfreisetzung über die Rekrutierung von Syk an das hemITAM von Dectin-1 und die Aktivierung des Card9/Bcl10/Malt1 Signalosoms läuft (Gross, Gewies et al. 2006, Ruland 2008, Hara and Saito 2009). Dabei wurde ebenfalls ein NF- κ B Reporterassay verwendet. Es zeigte sich, dass die alleinige Überexpression von Card9 oder Bcl10 nur zu einer geringen NF- κ B Aktivierung, die Koexpression aber zu einer synergistischen Verstärkung des Luziferasignals und somit zu einem starken, nicht durch Stimulation beeinflussbaren Hintergrundsignal führt. Dieses Phänomen konnte auch in dieser Arbeit beobachtet werden.

Die meisten Studien, die sich mit der funktionellen Rolle des Card9/Bcl10/Malt1 Signalosoms befassen, wurden mit dendritischen Zellen oder Monozyten/Makrophagen durchgeführt (Gross, Gewies et al. 2006, Wegener and Krappmann 2007, Ruland 2008, Hara and Saito 2009, Kerrigan and Brown 2009). Obwohl gezeigt wurde, dass humane Granulozyten während der Inflammation eine Hauptquelle für Zytokinfreisetzung sind (Mantovani, Cassatella et al. 2011, Jaillon, Galdiero et al. 2013), gibt es neben CEACAM3 (Sintsova, Sarantis et al. 2014) nur wenige Studien, die die Bedeutung ITAM-tragender Rezeptoren für die Zytokininduktion untersucht haben. So zeigten Cheung et al, 2011, in einem Mausmodell, dass die Aktivierung des neutrophilen ITAM-assoziierten Rezeptors CLEC5A durch sterile Leberverletzung zu einer lethalen TNF α Produktion führt (Cheung, Shen et al. 2011). Eine andere Studie weist die funktionelle Bedeutung von Card9 in Granulozyten nach. Hier wurde gezeigt, dass die Granulozyten Card9-defizienter Patienten Störungen in der Produktion inflammatorischer Zytokine aufweisen (Drewniak, Gazendam et al. 2013). Diese Studie und die Ergebnisse der vorliegenden Doktorarbeit weisen darauf hin, dass die Induktion der granulozytären Zytokinfreisetzung über das Card9/Bcl10/Malt1 Signalosom durch

ITAM-assoziierte Rezeptoren eine große Bedeutung bei der Steuerung der Immunantworten auf spezifische Pathogene haben könnte.

Obwohl in Studien Rezeptoren und ihre Signalwege zumeist unabhängig von allen anderen exprimierten Rezeptoren betrachtet werden, ist davon auszugehen, dass es *in vivo* zu Interaktionen zwischen verschiedenen Signalwegen kommt. Neben dem in dieser Arbeit beschriebenen CEACAM3-Syk-Card9 Signalweg, werden möglicherweise auch noch andere Signalwege CEACAM3-ITAM abhängig induziert. Für Dectin-1 z. B. ist bekannt, dass es mit TLR2 kollaboriert und so eine optimale Zytokinantwort in Makrophagen induziert. Eine Studie von Dennehy et. al konnte nachweisen, dass für diese Zusammenarbeit der Syk Signalweg verwendet wird und auch TLR4,5,7 und 9 involviert sein können. Sowohl eine Syk-Defizienz als auch das Fehlen des TLR Adaptorproteins MyD88 unterbricht den synergistischen Effekt auf die TNF, CCL3 und CXCL2 Produktion. Die Zusammenarbeit beider Signalwege resultiert in einer anhaltenden I κ B Degradation und einer verstärkten NF- κ B Translokation in den Nukleus (Dennehy, Ferwerda et al. 2008). Auch für andere ITAM-assoziierte Rezeptoren ist bekannt, dass sie die TLR-vermittelte proinflammatorische Immunantwort verstärken können, indem zwar verschiedene Signalwege aktiviert werden, diese aber an verbreitet vorkommenden Signaleffektoren wie NF- κ B oder MAP-Kinasen zusammenlaufen (Ivashkiv 2009). Es ist vorstellbar, dass CEACAM3 ebenfalls in der Lage ist über die Rekrutierung der Syk Kinase mit verschiedenen TLRs zu kollaborieren, was den proinflammatorischen Effekt, der in dieser Arbeit gezeigt wurde, noch verstärken könnte.

Experimente mit Primärzellen unterliegen oftmals starken interindividuellen Schwankungen. Auch in dieser Arbeit gab es Probanden, die eine sehr starke CEACAM3 abhängige Immunantwort zeigten, während diese bei anderen kaum induzierbar war.

Interessanterweise schien das zumindest teilweise von dem CEACAM Expressionsmuster abhängig zu sein. Wie die Kontrollversuche mit dem CEACAM1-blockenden Antikörper zeigten, führt eine Interaktion von *M. catarrhalis* und CEACAM1 tendenziell zu einer Inhibition der CXCL8 Immunantwort. Dies ist wenig überraschend und beruht wahrscheinlich auf der Inhibition des TLR2 Signalwegs durch das CEACAM1-ITIM, wie es bereits für das Bronchialepithel beschrieben wurde (Slevogt, Zabel et al. 2008). Geht man davon aus, dass *M. catarrhalis* sowohl an CEACAM1 als auch an

CEACAM3 auf der granulozytären Oberfläche bindet, käme es sowohl zu NF- κ B Inhibition als auch zu NF- κ B Aktivierung. Abhängig vom Expressionsmuster könnte der CEACAM1 oder der CEACAM3 Signalweg überwiegen.

Desweiteren können interindividuelle Unterschiede auch auf der unterschiedlichen Funktionsfähigkeit der beteiligten Rezeptoren und Adaptoren beruhen. In den letzten Jahren hat die Erforschung von Einzelnukleotid-Polymorphismen (single nucleotide polymorphisms SNPs) an Bedeutung gewonnen. Dabei wird untersucht, ob bestimmte SNPs mit Erkrankungen korreliert sind. Eine Studie aus dem Jahr 2012 z.B. befasst sich mit verschiedenen genetischen Varianten und deren Auswirkungen auf das Risiko eine COPD zu entwickeln (de Andrade, Li et al. 2012). Interessant wäre es zu untersuchen ob auch für CEACAM3 verschiedene genetische Varianten vorliegen, die zum einen die Funktionsfähigkeit beeinträchtigen und zum anderen vielleicht sogar mit dem Verlauf einer COPD korreliert sind.

Unter Verwendung primärer humaner Bronchialepithelzellen konnte gezeigt werden, dass die COPD-assoziierten Pathogene *M. catarrhalis* und *H. influenzae* in der Lage sind die Expression von CEACAM1 nicht aber von CEACAM5 und 6 auf den Wirtszellen zu erhöhen (Klaile, Klassert et al. 2013). Auch hier wäre es von Interesse zu prüfen, ob eine Regulation der CEACAM Expression auf humanen Granulozyten stattfindet und ggf. ob alle CEACAMs gleichermaßen reguliert werden.

8.3 Die Bedeutung der Granulozytenaktivierung für die Pathogenese der COPD

In den entzündeten Atemwegen von COPD Patienten finden sich verschiedene inflammatorische Zellen wie neutrophile Granulozyten, Makrophagen, T-Lymphozyten und Dendritische Zellen. Sie alle tragen z. B. durch Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies, Chemokinen, Zytokinen, Proteasen und Matrixmetalloproteinasen zu der Entstehung einer chronischen Inflammation bei (Nurwidya, Damayanti et al. 2016).

Neutrophile Granulozyten sind in kleiner Anzahl immer im Lungengewebe präsent, von wo aus sie schnell zum Ort der Infektion oder Verletzung gelangen. Die Migration erfolgt entlang proinflammatorischer Chemokingradienten, die von Epithelzellen und Alveolarmakrophagen freigesetzt werden. Im Lungenparenchym werden dann Bakterien

durch die Neutrophilen phagozytiert und antimikrobielle Faktoren und hoch reaktive Sauerstoffspezies ausgeschüttet, welche die Pathogene inaktivieren. Wird diese Neutrophilen-vermittelte inflammatorische Immunantwort nicht ausreichend kontrolliert, führt sie auch zu einer Schädigung des Lungengewebes.

Es ist bekannt, dass es bei der COPD zu einer verstärkten Neutrophilie kommt. Es gibt eine Studie die aufzeigt, dass das Verhältnis von Neutrophilen zu Lymphozyten (N/L-Ratio-NLR) genutzt werden kann um die Schwere einer Entzündung zu bestimmen und akute Exazerbationen zu erkennen. Dabei lassen sich ab einem Wert von 3,29 COPD Exazerbationen mit einer Sensitivität von 80,8 % und einer Spezifität von 77,7 % von einfachen Erkältungen abgrenzen (Taylan, Demir et al. 2015). Zusätzlich sind die NLR Werte stabiler COPD Patienten signifikant höher als die Werte gesunder Kontrollpersonen (Gunay, Sarinc Ulasli et al. 2014).

Zusätzlich wurde beobachtet, dass die verstärkte Neutrophilie in der COPD nicht unbedingt zu einer effektiven Elimination von Bakterien, sondern zu verstärkter Ausprägung von Atemwegsobstruktion und, u.a. durch Freisetzung der Neutrophilen Elastase (NE), zur emphysematösen Zerstörung von Lungengewebe führt (Shaykhiev and Crystal 2013). Neben Proteasen, wie der Neutrophilen Elastase wird auch die Myeloperoxidase (MPO) aus azurophilen Granula sezerniert. Es konnte gezeigt werden, dass die MPO ebenso wie die NE in der Lage ist direkt die inflammatorische Immunantwort heraufzuregulieren. Es kommt zur Freisetzung von IL-6, CXCL8 und reaktiven Sauerstoffspezies durch Endothelzellen, zur Induktion von TNF-alpha Sekretion durch Makrophagen und zur Aktivierung weiterer neutrophiler Granulozyten, gefolgt von einer verstärkten Degranulation (Lefkowitz, Roberts et al. 2000, Yang, Preston et al. 2001, Hoenderdos and Condliffe 2013). Die vorliegende Arbeit zeigt, dass eine Infektion mit *M. catarrhalis*, UspA1- und CEACAM3- abhängig die Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies und der MPO aus Granulozyten induziert. Es kann davon ausgegangen werden, dass eine akute Exazerbation durch *M. catarrhalis* zur Schädigung des Lungengewebes in der COPD beiträgt.

Die in dieser Arbeit nachgewiesene *Moraxella*-induzierte CEACAM3-abhängige Freisetzung von Chemokinen trägt ebenfalls zur Pathogenese der COPD bei. Während die induzierte CXCL8 Freisetzung primär die Einwanderung weiterer neutrophiler Granulozyten verursacht, sind Mitglieder der Mip-1 Familie, CCL3 und CCL4, dafür bekannt weitere pro-inflammatorische Zellen zu rekrutieren. Zum einen spielen sie eine

wichtige Rolle bei der Regulation der transendothelialen Migration von Monozyten, Dendritischen Zellen und NK Zellen, zum anderen sind sie an der T-Zell Chemotaxis beteiligt (Maurer and von Stebut 2004).

In den letzten Jahren ist eine weitere Funktion der neutrophilen Granulozyten in den Focus der Forschung gerückt. Über einen NETosis genannten Zelltodmechanismus, der u.a. durch CXCL8 ausgelöst wird, setzen aktivierte Neutrophile *neutrophil extracellular traps* (NETs) frei (Brinkmann, Reichard et al. 2004). Diese netzartigen extrazellulären Strukturen bestehen aus dekondensiertem Chromatin in Verbindung mit Histonen und Enzymen wie NE und MPO und sind sowohl antimikrobiell als auch potentiell zytotoxisch (Fuchs, Abed et al. 2007). Zwei kürzlich veröffentlichte Studien zeigen, dass die NETs-Bildung auch in der COPD eine Rolle spielt und sowohl die chronische Entzündung als auch die Lungengewebsbeschädigung vorantreibt. Grabcanovic-Musija et al. wiesen im Sputum von COPD Patienten NETs nach, deren hohes Vorkommen mit der Schwere der Erkrankung assoziiert ist: über 90% in akuter Exazerbation, 45% in der stabilen COPD, 25% in rauchenden Kontrollen und weniger als 5% in der nicht rauchenden Kontrollgruppe. Die NET-Bildung ist somit nicht auf die Exazerbation beschränkt, aber korreliert mit der Schwere der Atemwegsobstruktion (Grabcanovic-Musija, Obermayer et al. 2015). Eine Arbeit aus 2016 beschäftigte sich mit NET-Bildung in der COPD und Asthma. Hier wurde gezeigt, dass die Akkumulation exzessiver NETs mit der Aktivierung der angeborenen Immunantwort einhergeht und somit den Krankheitsverlauf in chronischen Atemwegserkrankungen vorantreibt (Wright, Gibson et al. 2016). An dieser Stelle könnten zusätzliche Versuche zeigen, ob die Aktivierung von humanen Granulozyten durch *M. catarrhalis* über CEACAM3 ebenfalls zu einer Induktion der NETosis führt. Zumindest eine *M. catarrhalis*-Abhängigkeit ist gut vorstellbar, da diese Bakterien nicht nur in der Exazerbation sondern auch als Kolonisierer der unteren Atemwege in der stabilen COPD von Bedeutung sind.

Interessant und keinesfalls zu vernachlässigen ist die Problematik, dass in mehreren Studien, eine gestörte Abwehrfunktion der Neutrophilen in COPD Patienten gezeigt werden konnte. Neutrophile aus dem Blut von Patienten mit mittlerer bis schwerer COPD zeigten eine deutlich höhere Migrationsgeschwindigkeit als die Neutrophilen gesunder Kontrollpersonen, während die Genauigkeit der Migration entlang klassischer chemischer Lockstoffe wie N-fomyl-Met-Leu-Phe (fMLP) oder CXCL8 signifikant abnahm. Dabei konnte eine Korrelation zwischen der verringerten Chemotaxis entlang

des fMLP-Gradienten und dem Grad der Atemwegsobstruktion nachgewiesen werden (Yoshikawa, Dent et al. 2007, Hoenderdos and Condcliffe 2013). Auch Komponenten aus dem Zigarettenrauch sind in der Lage, die Ausschüttung reaktiver Sauerstoffspezies durch Neutrophile sowie deren Fähigkeit zur Phagozytose zu inhibieren (Zappacosta, Persichilli et al. 2005, Shaykhiev and Crystal 2013). An dieser Stelle wäre es interessant, die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Versuche ebenfalls mit Neutrophilen aus dem Blut von Patienten mit verschiedenen COPD-Stadien und Raucher vs. Nichtraucher durchzuführen. Unterschiede in der *Moraxella*-induzierten Zytokinsekretion durch neutrophile Granulozyten könnten so entdeckt und mögliche Korrelationen mit der Schwere der Erkrankung nachgewiesen werden.

Zusammenfassend zeigt die vorliegende Doktorarbeit, dass *Moraxella* UspA1 über die Interaktion mit CEACAM3 in der Lage ist humane Granulozyten zu aktivieren und somit zahlreiche granulozytäre Immunantworten zu induzieren. Die Identifikation von CEACAM3 als Muster-erkennender Rezeptor für die Aktivierung von Granulozyten über Card9 liefert den ersten Beweis für einen Signalweg der eine Bedeutung bei der proinflammatorischen Immunantwort in der COPD haben könnte. Weitere Studien, die die Bedeutung von CEACAM3 näher beleuchten, sind notwendig, um entscheiden zu können, ob es sich hierbei um ein therapeutisches Ziel für die Modulation der inflammatorischen Immunantwort sowohl während der *M. catarrhalis*-induzierten Exazerbation, als auch bei der pathologischen Kolonisierung der unteren Atemwege in COPD Patienten, handelt.

9 Ausblick

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass *M. catarrhalis* in der Lage ist, mit seinem Oberflächenprotein UspA1 an den Granulozyten-spezifischen Rezeptor CEACAM3, an der Oberfläche von humanen Granulozyten, zu binden. Diese Interaktion führt zum einen zu einer Aktivierung der neutrophilen Granulozyten, die sich in der Induktion der Degranulation und der Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies zeigt. Zum anderen kommt es unter Beteiligung des Syk/Card9 Signalweges zu einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B, gefolgt von einer erhöhten Ausschüttung von Chemokinen.

Während der Signalweg beschrieben ist, sind die genauen Auswirkungen auf die Pathogenese der COPD noch unzureichend geklärt. Auch der Einfluss der COPD auf den beschriebenen Signalweg ist noch unerforscht. Wie bereits in der Diskussion erwähnt, sind folgende weiterführende Untersuchungen denkbar:

- Um Unterschiede in der *Moraxella*-induzierten Zytokinsekretion zu entdecken, könnten die in dieser Arbeit gezeigten Versuche ebenfalls mit Neutrophilen aus dem Blut von Patienten mit verschiedenen COPD-Stadien durchgeführt werden. Auch ein Vergleich Raucher vs. Nichtraucher wäre interessant.
- Weiterführende Experimente könnten klären, ob die *Moraxella*-induzierte Aktivierung der humanen Granulozyten auch die Induktion der NETosis umfasst.
- Es könnte überprüft werden, inwiefern es für CEACAM3 genetische Variationen, sogenannte SNPs, gibt, die einen Einfluss auf die Funktionsfähigkeit des Rezeptors haben und möglicherweise mit der Schwere der Erkrankung korreliert sind.
- Da Moraxellen auch die Atemwege in Patienten mit stabiler COPD besiedeln, wäre es interessant zu untersuchen, ob die Bakterien in der Lage sind, die CEACAM Expression auf humanen Granulozyten zu beeinflussen. Wenn eine Regulation nachgewiesen werden kann, muss geprüft werden, ob alle CEACAMs gleichermaßen reguliert werden.

Diese weiterführenden Experimente könnten helfen die Bedeutung der CEACAM3-UspA1 Interaktion für die Pathogenese der COPD besser zu verstehen.

10 Literatur- und Quellenverzeichnis

- Ackermann, N., M. Tiller, G. Anding, A. Roggenkamp and J. Heesemann (2008).** "Contribution of trimeric autotransporter C-terminal domains of oligomeric coiled-coil adhesin (Oca) family members YadA, UspA1, EibA, and Hia to translocation of the YadA passenger domain and virulence of *Yersinia enterocolitica*." J Bacteriol 190(14): 5031-5043.
- Aebi, C., E. R. Lafontaine, L. D. Cope, J. L. Latimer, S. L. Lumbley, G. H. McCracken, Jr. and E. J. Hansen (1998).** "Phenotypic effect of isogenic uspA1 and uspA2 mutations on *Moraxella catarrhalis* 035E." Infect Immun 66(7): 3113-3119.
- Akira, S., S. Uematsu and O. Takeuchi (2006).** "Pathogen recognition and innate immunity." Cell 124(4): 783-801.
- Ariki, S., C. Nishitani and Y. Kuroki (2012).** "Diverse functions of pulmonary collectins in host defense of the lung." J Biomed Biotechnol 2012: 532071.
- Billker, O., A. Popp, V. Brinkmann, G. Wenig, J. Schneider, E. Caron and T. F. Meyer (2002).** "Distinct mechanisms of internalization of *Neisseria gonorrhoeae* by members of the CEACAM receptor family involving Rac1- and Cdc42-dependent and -independent pathways." Embo j 21(4): 560-571.
- Borreagaard, N. (2010).** "Neutrophils, from marrow to microbes." Immunity 33(5): 657-670.
- Brinkmann, V., U. Reichard, C. Goosmann, B. Fauler, Y. Uhlemann, D. S. Weiss, Y. Weinrauch and A. Zychlinsky (2004).** "Neutrophil extracellular traps kill bacteria." Science 303(5663): 1532-1535.
- Brinkmann, V. and A. Zychlinsky (2012).** "Neutrophil extracellular traps: is immunity the second function of chromatin?" J Cell Biol 198(5): 773-783.
- Brooks, M. J., J. L. Sedillo, N. Wagner, W. Wang, A. S. Attia, H. Wong, C. A. Laurence, E. J. Hansen and S. D. Gray-Owen (2008).** "*Moraxella catarrhalis* binding to host cellular receptors is mediated by sequence-specific determinants not conserved among all UspA1 protein variants." Infect Immun 76(11): 5322-5329.
- Brown, G. D. (2006).** "Dectin-1: a signalling non-TLR pattern-recognition receptor." Nat Rev Immunol 6(1): 33-43.
- Buntru, A., A. Roth, N. J. Nyffenegger-Jann and C. R. Hauck (2012).** "HemITAM signaling by CEACAM3, a human granulocyte receptor recognizing bacterial pathogens." Arch Biochem Biophys 524(1): 77-83.
- Cassatella, M. A. (1995).** "The production of cytokines by polymorphonuclear neutrophils." Immunol Today 16(1): 21-26.
- Chen, T. and E. C. Gotschlich (1996).** "CGM1a antigen of neutrophils, a receptor of gonococcal opacity proteins." Proc Natl Acad Sci U S A 93(25): 14851-14856.
- Cheung, R., F. Shen, J. H. Phillips, M. J. McGeachy, D. J. Cua, P. G. Heyworth and R. H. Pierce (2011).** "Activation of MDL-1 (CLEC5A) on immature myeloid cells triggers lethal shock in mice." J Clin Invest 121(11): 4446-4461.
- de Andrade, M., Y. Li, R. S. Marks, C. Deschamps, P. D. Scanlon, C. L. Olswold, R. Jiang, S. J. Swensen, Z. Sun, J. M. Cunningham, J. A. Wampfler, A. H. Limper, D. E. Midthun and P. Yang (2012).** "Genetic variants associated with the risk of chronic obstructive pulmonary disease with and without lung cancer." Cancer Prev Res (Phila) 5(3): 365-373.
- de Vries, S. P., H. J. Bootsma, J. P. Hays and P. W. Hermans (2009).** "Molecular aspects of *Moraxella catarrhalis* pathogenesis." Microbiol Mol Biol Rev 73(3): 389-406, Table of Contents.

- Delgado Tascon, J., J. Adrian, K. Kopp, P. Scholz, M. P. Tschan, K. Kuespert and C. R. Hauck (2015).** "The granulocyte orphan receptor CEACAM4 is able to trigger phagocytosis of bacteria." *J Leukoc Biol* 97(3): 521-531.
- Dennehy, K. M., G. Ferwerda, I. Faro-Trindade, E. Pyz, J. A. Willment, P. R. Taylor, A. Kerrigan, S. V. Tsoni, S. Gordon, F. Meyer-Wentrup, G. J. Adema, B. J. Kullberg, E. Schweighoffer, V. Tybulewicz, H. M. Mora-Montes, N. A. Gow, D. L. Williams, M. G. Netea and G. D. Brown (2008).** "Syk kinase is required for collaborative cytokine production induced through Dectin-1 and Toll-like receptors." *Eur J Immunol* 38(2): 500-506.
- Drewniak, A., R. P. Gazendam, A. T. Tool, M. van Houdt, M. H. Jansen, J. L. van Hamme, E. M. van Leeuwen, D. Roos, E. Scalais, C. de Beaufort, H. Janssen, T. K. van den Berg and T. W. Kuijpers (2013).** "Invasive fungal infection and impaired neutrophil killing in human CARD9 deficiency." *Blood* 121(13): 2385-2392.
- Dy, R. and S. Sethi (2016).** "The lung microbiome and exacerbations of COPD." *Curr Opin Pulm Med* 22(3): 196-202.
- Eldika, N. and S. Sethi (2006).** "Role of nontypeable *Haemophilus influenzae* in exacerbations and progression of chronic obstructive pulmonary disease." *Curr Opin Pulm Med* 12(2): 118-124.
- Fuchs, T. A., U. Abed, C. Goosmann, R. Hurwitz, I. Schulze, V. Wahn, Y. Weinrauch, V. Brinkmann and A. Zychlinsky (2007).** "Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps." *J Cell Biol* 176(2): 231-241.
- Gantner, B. N., R. M. Simmons, S. J. Canavera, S. Akira and D. M. Underhill (2003).** "Collaborative induction of inflammatory responses by dectin-1 and Toll-like receptor 2." *J Exp Med* 197(9): 1107-1117.
- Gebauer, F., D. Wicklein, J. Horst, P. Sundermann, H. Maar, T. Streichert, M. Tachezy, J. R. Izbicki, M. Bockhorn and U. Schumacher (2014).** "Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecules (CEACAM) 1, 5 and 6 as biomarkers in pancreatic cancer." *PLoS One* 9(11): e113023.
- Grabcanovic-Musija, F., A. Obermayer, W. Stoiber, W. D. Krautgartner, P. Steinbacher, N. Winterberg, A. C. Bathke, M. Klappacher and M. Studnicka (2015).** "Neutrophil extracellular trap (NET) formation characterises stable and exacerbated COPD and correlates with airflow limitation." *Respir Res* 16: 59.
- Gray-Owen, S. D. and R. S. Blumberg (2006).** "CEACAM1: contact-dependent control of immunity." *Nat Rev Immunol* 6(6): 433-446.
- Gross, O., A. Gewies, K. Finger, M. Schafer, T. Sparwasser, C. Peschel, I. Forster and J. Ruland (2006).** "Card9 controls a non-TLR signalling pathway for innate anti-fungal immunity." *Nature* 442(7103): 651-656.
- Gunay, E., S. Sarinc Ulasli, O. Akar, A. Ahsen, S. Gunay, T. Koyuncu and M. Unlu (2014).** "Neutrophil-to-lymphocyte ratio in chronic obstructive pulmonary disease: a retrospective study." *Inflammation* 37(2): 374-380.
- Hall-Stoodley, L., J. W. Costerton and P. Stoodley (2004).** "Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases." *Nat Rev Microbiol* 2(2): 95-108.
- Hara, H. and T. Saito (2009).** "CARD9 versus CARMA1 in innate and adaptive immunity." *Trends Immunol* 30(5): 234-242.
- Heinrich, A., K. A. Heyl, E. Klaile, M. M. Muller, T. E. Klassert, A. Wiessner, K. Fischer, R. R. Schumann, U. Seifert, K. Riesbeck, A. Moter, B. B. Singer, S. Bachmann and H. Slevogt (2016).** "Moraxella catarrhalis induces CEACAM3-Syk-CARD9-dependent activation of human granulocytes." *Cell Microbiol* 18(11): 1570-1582.

- Heyl, K.A. (2014).** "Die Bedeutung von Dectin-1 für die nontypeable *Haemophilus influenzae* (NTHi) induzierte Immunantwort des humanen Lungenepithels" URL: https://www.dbthueringen.de/servlets/MCRFileNodeServlet/dbt_derivate_00029792/Dissertation%20KAHeyl.pdf
- Heyl, K. A., T. E. Klassert, A. Heinrich, M. M. Muller, E. Klaile, H. Dienemann, C. Grunewald, R. Bals, B. B. Singer and H. Slevogt (2014).** "Dectin-1 is expressed in human lung and mediates the proinflammatory immune response to nontypeable *Haemophilus influenzae*." *MBio* 5(5): e01492-01414.
- Hill, D. J. and M. Virji (2003).** "A novel cell-binding mechanism of *Moraxella catarrhalis* ubiquitous surface protein UspA: specific targeting of the N-domain of carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecules by UspA1." *Mol Microbiol* 48(1): 117-129.
- Hoenderdos, K. and A. Condliffe (2013).** "The neutrophil in chronic obstructive pulmonary disease." *Am J Respir Cell Mol Biol* 48(5): 531-539.
- Holloway, R. A. and L. E. Donnelly (2013).** "Immunopathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease." *Curr Opin Pulm Med* 19(2): 95-102.
- Hu, G., Y. Zhou, J. Tian, W. Yao, J. Li, B. Li and P. Ran (2010).** "Risk of COPD from exposure to biomass smoke: a metaanalysis." *Chest* 138(1): 20-31.
- Ivashkiv, L. B. (2009).** "Cross-regulation of signaling by ITAM-associated receptors." *Nat Immunol* 10(4): 340-347.
- Jacobi, T. (2008).** Der Einfluss von all-trans-Retinsäure auf die Expression von CEACAMs bei humanen Akute-Promyelozytenleukämie - und Akute-myeloische Leukämie - Zelllinien [WWW document]. URL: http://www.diss.fu-belin.de/diss/servlets/MCRFileNodeServlet/FUDISS_derivate_000000003749/0_Dissertation0608.pdf
- Jaillon, S., M. R. Galdiero, D. Del Prete, M. A. Cassatella, C. Garlanda and A. Mantovani (2013).** "Neutrophils in innate and adaptive immunity." *Semin Immunopathol* 35(4): 377-394.
- Javaheri, A., T. Kruse, K. Moonens, R. Mejias-Luque, A. Debraekeleer, C. I. Asche, N. Tegtmeyer, B. Kalali, N. C. Bach, S. A. Sieber, D. J. Hill, V. Koniger, C. R. Hauck, R. Moskalenko, R. Haas, D. H. Busch, E. Klaile, H. Slevogt, A. Schmidt, S. Backert, H. Remaut, B. B. Singer and M. Gerhard (2016).** "Helicobacter pylori adhesin HopQ engages in a virulence-enhancing interaction with human CEACAMs." *Nat Microbiol* 2: 16189.
- Kerrigan, A. M. and G. D. Brown (2009).** "C-type lectins and phagocytosis." *Immunobiology* 214(7): 562-575.
- Klaile, E., T. E. Klassert, I. Scheffrahn, M. M. Muller, A. Heinrich, K. A. Heyl, H. Dienemann, C. Grunewald, R. Bals, B. B. Singer and H. Slevogt (2013).** "Carcinoembryonic antigen (CEA)-related cell adhesion molecules are co-expressed in the human lung and their expression can be modulated in bronchial epithelial cells by non-typable *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, TLR3, and type I and II interferons." *Respir Res* 14: 85.
- Klaile, E., O. Vorontsova, K. Sigmundsson, M. M. Muller, B. B. Singer, L. G. Ofverstedt, S. Svensson, U. Skoglund and B. Obrink (2009).** "The CEACAM1 N-terminal Ig domain mediates cis- and trans-binding and is essential for allosteric rearrangements of CEACAM1 microclusters." *J Cell Biol* 187(4): 553-567.
- Kuespert, K., S. Pils and C. R. Hauck (2006).** "CEACAMs: their role in physiology and pathophysiology." *Curr Opin Cell Biol* 18(5): 565-571.

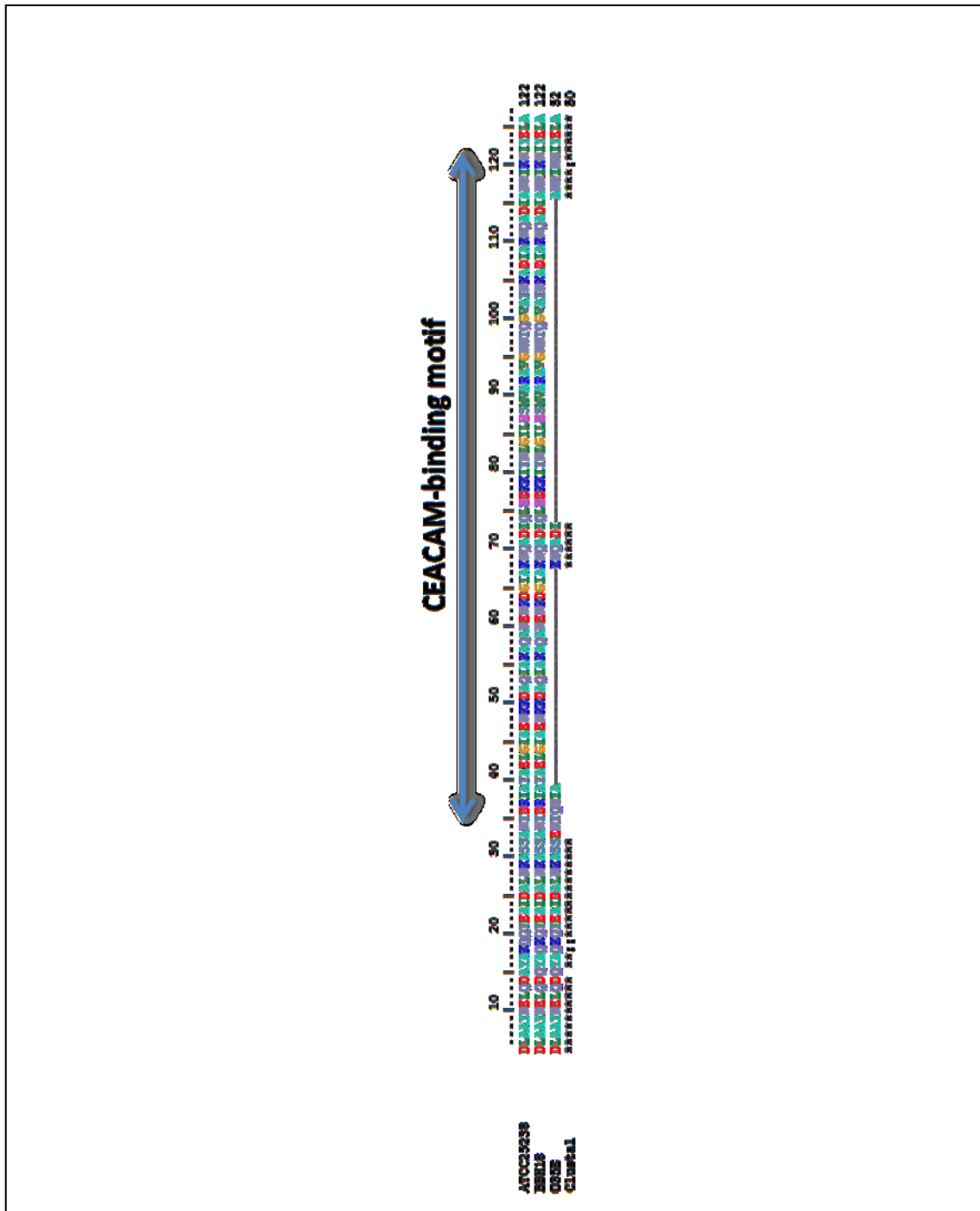
- Lafontaine, E. R., N. J. Wagner and E. J. Hansen (2001).** "Expression of the *Moraxella catarrhalis* UspA1 protein undergoes phase variation and is regulated at the transcriptional level." J Bacteriol 183(5): 1540-1551.
- Lefkowitz, D. L., E. Roberts, K. Grattendick, C. Schwab, R. Stuart, J. Lincoln, R. C. Allen, N. Moguilevsky, A. Bollen and S. S. Lefkowitz (2000).** "The endothelium and cytokine secretion: the role of peroxidases as immunoregulators." Cell Immunol 202(1): 23-30.
- Livak, K.J. and Schmittgen T.D. (2001).** "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(delta delta C(T)) Method" Methods 2001 Dec;25(4):402-8
- Mammen, M. J. and S. Sethi (2016).** "COPD and the microbiome." Respirology 21(4): 590-599.
- Mantovani, A., M. A. Cassatella, C. Costantini and S. Jaillon (2011).** "Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity." Nat Rev Immunol 11(8): 519-531.
- Maurer, M. and E. von Stebut (2004).** "Macrophage inflammatory protein-1." Int J Biochem Cell Biol 36(10): 1882-1886.
- McCaw, S. E., J. Schneider, E. H. Liao, W. Zimmermann and S. D. Gray-Owen (2003).** "Immunoreceptor tyrosine-based activation motif phosphorylation during engulfment of *Neisseria gonorrhoeae* by the neutrophil-restricted CEACAM3 (CD66d) receptor." Mol Microbiol 49(3): 623-637.
- Miravittles, M. and A. Anzueto (2015).** "Role of infection in exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease." Curr Opin Pulm Med 21(3): 278-283.
- Mocsai, A. (2013).** "Diverse novel functions of neutrophils in immunity, inflammation, and beyond." J Exp Med 210(7): 1283-1299.
- Moter, A., G. Leist, R. Rudolph, K. Schrank, B. K. Choi, M. Wagner and U. B. Gobel (1998).** "Fluorescence in situ hybridization shows spatial distribution of as yet uncultured treponemes in biopsies from digital dermatitis lesions." Microbiology 144 (Pt 9): 2459-2467.
- Murphy, T. F. and G. I. Parameswaran (2009).** "*Moraxella catarrhalis*, a human respiratory tract pathogen." Clin Infect Dis 49(1): 124-131.
- N'Guessan, P. D., H. Haarmann, T. Steiner, K. Heyl, F. Schreiber, A. Heinrich and H. Slevogt (2014).** "The *Moraxella catarrhalis*-induced pro-inflammatory immune response is enhanced by the activation of the epidermal growth factor receptor in human pulmonary epithelial cells." Biochem Biophys Res Commun 450(2): 1038-1044.
- N'Guessan, P. D., M. Vigelahn, S. Bachmann, S. Zabel, B. Opitz, B. Schmeck, S. Hippenstiel, J. Zweigner, K. Riesbeck, B. B. Singer, N. Suttrop and H. Slevogt (2007).** "The UspA1 protein of *Moraxella catarrhalis* induces CEACAM-1-dependent apoptosis in alveolar epithelial cells." J Infect Dis 195(11): 1651-1660.
- Nordstrom, T., A. M. Blom, A. Forsgren and K. Riesbeck (2004).** "The emerging pathogen *Moraxella catarrhalis* interacts with complement inhibitor C4b binding protein through ubiquitous surface proteins A1 and A2." J Immunol 173(7): 4598-4606.
- Nurwidya, F., T. Damayanti and F. Yunus (2016).** "The Role of Innate and Adaptive Immune Cells in the Immunopathogenesis of Chronic Obstructive Pulmonary Disease." Tuberc Respir Dis (Seoul) 79(1): 5-13.
- Parameswaran, G. I., C. T. Wrona, T. F. Murphy and S. Sethi (2009).** "*Moraxella catarrhalis* acquisition, airway inflammation and protease-antiprotease balance in chronic obstructive pulmonary disease." BMC Infect Dis 9: 178.

- Parker, H., A. M. Albrett, A. J. Kettle and C. C. Winterbourn (2012).** "Myeloperoxidase associated with neutrophil extracellular traps is active and mediates bacterial killing in the presence of hydrogen peroxide." *J Leukoc Biol* 91(3): 369-376.
- Pearson, M. M. and E. J. Hansen (2007).** "Identification of gene products involved in biofilm production by *Moraxella catarrhalis* ETSU-9 in vitro." *Infect Immun* 75(9): 4316-4325.
- Pils, S., K. Kopp, L. Peterson, J. Delgado Tascon, N. J. Nyffenegger-Jann and C. R. Hauck (2012).** "The adaptor molecule Nck localizes the WAVE complex to promote actin polymerization during CEACAM3-mediated phagocytosis of bacteria." *PLoS One* 7(3): e32808.
- Ruland, J. (2008).** "CARD9 signaling in the innate immune response." *Ann N Y Acad Sci* 1143: 35-44.
- Sarantis, H. and S. D. Gray-Owen (2007).** "The specific innate immune receptor CEACAM3 triggers neutrophil bactericidal activities via a Syk kinase-dependent pathway." *Cell Microbiol* 9(9): 2167-2180.
- Sarantis, H. and S. D. Gray-Owen (2012).** "Defining the roles of human carcinoembryonic antigen-related cellular adhesion molecules during neutrophil responses to *Neisseria gonorrhoeae*." *Infect Immun* 80(1): 345-358.
- Schmitter, T., F. Agerer, L. Peterson, P. Munzner and C. R. Hauck (2004).** "Granulocyte CEACAM3 is a phagocytic receptor of the innate immune system that mediates recognition and elimination of human-specific pathogens." *J Exp Med* 199(1): 35-46.
- Schmitter, T., S. Pils, V. Sakk, R. Frank, K. D. Fischer and C. R. Hauck (2007).** "The granulocyte receptor carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 3 (CEACAM3) directly associates with Vav to promote phagocytosis of human pathogens." *J Immunol* 178(6): 3797-3805.
- Sethi, S., J. Maloney, L. Grove, C. Wrona and C. S. Berenson (2006).** "Airway inflammation and bronchial bacterial colonization in chronic obstructive pulmonary disease." *Am J Respir Crit Care Med* 173(9): 991-998.
- Sethi, S. and T. F. Murphy (2008).** "Infection in the pathogenesis and course of chronic obstructive pulmonary disease." *N Engl J Med* 359(22): 2355-2365.
- Shaykhiev, R. and R. G. Crystal (2013).** "Innate immunity and chronic obstructive pulmonary disease: a mini-review." *Gerontology* 59(6): 481-489.
- Singer, B. B., L. Opp, A. Heinrich, F. Schreiber, R. Binding-Liermann, L. C. Berrocal-Almanza, K. A. Heyl, M. M. Muller, A. Weimann, J. Zweigner and H. Slevogt (2014).** "Soluble CEACAM8 interacts with CEACAM1 inhibiting TLR2-triggered immune responses." *PLoS One* 9(4): e94106.
- Singer, B. B., I. Scheffrahn, R. Heymann, K. Sigmundsson, R. Kammerer and B. Obrink (2002).** "Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 expression and signaling in human, mouse, and rat leukocytes: evidence for replacement of the short cytoplasmic domain isoform by glycosylphosphatidylinositol-linked proteins in human leukocytes." *J Immunol* 168(10): 5139-5146.
- Sintsova, A., H. Sarantis, E. A. Islam, C. X. Sun, M. Amin, C. H. Chan, C. P. Stanners, M. Glogauer and S. D. Gray-Owen (2014).** "Global analysis of neutrophil responses to *Neisseria gonorrhoeae* reveals a self-propagating inflammatory program." *PLoS Pathog* 10(9): e1004341.
- Slevogt, H., J. Seybold, K. N. Tiwari, A. C. Hocke, C. Jonatatz, S. Dietel, S. Hippenstiel, B. B. Singer, S. Bachmann, N. Suttorp and B. Opitz (2007).** "*Moraxella catarrhalis* is internalized in respiratory epithelial cells by a trigger-like mechanism and

- initiates a TLR2- and partly NOD1-dependent inflammatory immune response." Cell Microbiol 9(3): 694-707.
- Slevogt, H., K. N. Tiwari, B. Schmeck, A. Hocke, B. Opitz, N. Suttorp and J. Seybold (2006).** "Adhesion of *Moraxella catarrhalis* to human bronchial epithelium characterized by a novel fluorescence-based assay." Med Microbiol Immunol 195(2): 73-83.
- Slevogt, H., S. Zabel, B. Opitz, A. Hocke, J. Eitel, D. N'Guessan P, L. Lucka, K. Riesbeck, W. Zimmermann, J. Zweigner, B. Temmesfeld-Wollbrueck, N. Suttorp and B. B. Singer (2008).** "CEACAM1 inhibits Toll-like receptor 2-triggered antibacterial responses of human pulmonary epithelial cells." Nat Immunol 9(11): 1270-1278.
- Soler, N., S. Ewig, A. Torres, X. Filella, J. Gonzalez and A. Zaubet (1999).** "Airway inflammation and bronchial microbial patterns in patients with stable chronic obstructive pulmonary disease." Eur Respir J 14(5): 1015-1022.
- Stampfli, M. R. and G. P. Anderson (2009).** "How cigarette smoke skews immune responses to promote infection, lung disease and cancer." Nat Rev Immunol 9(5): 377-384.
- Taraseviciene-Stewart and Voelkel, N.F. (2008).** "Molekular pathogenesis of emphysema" J Clin Invest 118(2):394-402.
- Taylan, M., M. Demir, H. Kaya, H. Selimoglu Sen, O. Abakay, A. I. Carkanat, A. Abakay, A. C. Tanrikulu and C. Sezgi (2015).** "Alterations of the neutrophil-lymphocyte ratio during the period of stable and acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease patients." Clin Respir J.
- Verduin, C. M., C. Hol, A. Fleer, H. van Dijk and A. van Belkum (2002).** "*Moraxella catarrhalis*: from emerging to established pathogen." Clin Microbiol Rev 15(1): 125-144.
- Wegener, E. and D. Krappmann (2007).** "CARD-Bcl10-Malt1 signalosomes: missing link to NF-kappaB." Sci STKE 2007(384): pe21.
- Whitsett, J. A. and T. Alenghat (2015).** "Respiratory epithelial cells orchestrate pulmonary innate immunity." Nat Immunol 16(1): 27-35.
- Whitsett, J. A., S. E. Wert and T. E. Weaver (2010).** "Alveolar surfactant homeostasis and the pathogenesis of pulmonary disease." Annu Rev Med 61: 105-119.
- Wright, T. K., P. G. Gibson, J. L. Simpson, V. M. McDonald, L. G. Wood and K. J. Baines (2016).** "Neutrophil extracellular traps are associated with inflammation in chronic airway disease." Respirology 21(3): 467-475.
- Yang, J. J., G. A. Preston, W. F. Pendergraft, M. Segelmark, P. Heeringa, S. L. Hogan, J. C. Jennette and R. J. Falk (2001).** "Internalization of proteinase 3 is concomitant with endothelial cell apoptosis and internalization of myeloperoxidase with generation of intracellular oxidants." Am J Pathol 158(2): 581-592.
- Yoshikawa, T., G. Dent, J. Ward, G. Angco, G. Nong, N. Nomura, K. Hirata and R. Djukanovic (2007).** "Impaired neutrophil chemotaxis in chronic obstructive pulmonary disease." Am J Respir Crit Care Med 175(5): 473-479.
- Zappacosta, B., S. Persichilli, A. Minucci, S. Fasanella, D. Scribano, B. Giardina and P. De Sole (2005).** "Effect of cigarette smoke extract on the polymorphonuclear leukocytes chemiluminescence: influence of a filter containing glutathione." Luminescence 20(2): 73-75.
- Zahradnik, S. (2014).** "Die *M. catarrhalis*-induzierte Verminderung viraler Rezeptoren und deren Bedeutung für die antivirale Immunantwort in pulmonalem Epithel" ULR http://www.diss.fu-berlin.de/diss/receive/FUDISS_thesis_000000096226

11 Anhang

11.1 Anhang 1 Sequenzanalyse



Anhang 1: UspA1 Sequenzanalyse. Sequenzanalyse der CEACAM Binderegion (blauer Pfeil) im UspA1 Protein. Zum Vergleich sind die Sequenzvariationen vom UspA1 der Moraxella Stämme BBH18, ATCC und O35E gezeigt (zur Verfügung gestellt von Kristian Riesbeck, Lund, Schweden).

11.2 Publikationsliste

- 2016 *Moraxella catarrhalis induces CEACAM3-Syk-CARD9-dependent activation of human granulocytes.* **Heinrich A**, Heyl KA, Klaile E, Müller MM, Klassert TE, Wiessner A, Fischer K, Schumann RR, Seifert U, Riesbeck K, Moter A, Singer BB, Bachmann S, Slevogt H. Cell Microbiol. 2016 Nov;18(11):1570-1582. doi: 10.1111/cmi.12597.
- 2016 *Moraxella catarrhalis decreases antiviral innate immune responses by down-regulation of TLR3 via inhibition of p53 in human bronchial epithelial cells.* **Heinrich A**, Haarmann H, Zahradnik S, Frenzel K, Schreiber F, Klassert TE, Heyl KA, Endres AS, Schmidtke M, Hofmann J, Slevogt H. FASEB J. 2016 Jun;30(6):2426-34. doi: 10.1096/fj.201500172R.
- 2015 *The role and regulation of Moraxella catarrhalis-induced human beta-defensin 3 expression in human pulmonary epithelial cells.* Haarmann H, Steiner T, Schreiber F, **Heinrich A**, Zweigner J, N'Guessan PD, Slevogt H. Biochem Biophys Res Commun. 2015 Nov 6;467(1):46-52. doi: 10.1016/j.bbrc.2015.09.126. Epub 2015 Sep 28.
- 2014 *Dectin-1 is expressed in human lung and mediates the proinflammatory immune response to nontypeable Haemophilus influenzae.* Heyl KA, Klassert TE, **Heinrich A**, Müller MM, Klaile E, Dienemann H, Grünewald C, Bals R, Singer BB, Slevogt H. MBio. 2014 Aug 26;5(5):e01492-14. doi: 10.1128/mBio.01492-14.
- 2014 *The Moraxella catarrhalis-induced pro-inflammatory immune response is enhanced by the activation of the epidermal growth factor receptor in human pulmonary epithelial cells.* N'Guessan PD, Haarmann H, Steiner T, Heyl K, Schreiber F, **Heinrich A**, Slevogt H. Biochem Biophys Res Commun. 2014 Jul 25;450(2):1038-44. doi: 10.1016/j.bbrc.2014.06.102. Epub 2014 Jun 27.
- 2014 *Soluble CEACAM8 interacts with CEACAM1 inhibiting TLR2-triggered immune responses.* Singer BB, Opp L, **Heinrich A**, Schreiber F, Binding-Liermann R, Berrocal-Almanza LC, Heyl KA, Müller MM, Weimann A, Zweigner J, Slevogt H. PLoS One. 2014 Apr 17;9(4):e94106. doi: 10.1371/journal.pone.0094106. eCollection 2014.
- 2013 *Carcinoembryonic antigen (CEA)-related cell adhesion molecules are co-expressed in the human lung and their expression can be modulated in bronchial epithelial cells by non-typable Haemophilus influenzae, Moraxella catarrhalis, TLR3, and type I and II interferons.* Klaile E, Klassert TE, Scheffrahn I, Müller MM, **Heinrich A**, Heyl KA, Dienemann H, Grünewald C, Bals R, Singer BB, Slevogt H. Respir Res. 2013 Aug 14;14:85. doi: 10.1186/1465-9921-14-85.

11.3 Danksagung

Zuallererst und herzlich danke ich Frau Prof. Dr. Hortense Slevogt, die dieses Thema zur Verfügung gestellt hat, für ihre engagierte Betreuung und ununterbrochene Unterstützung in allen Phasen des Projektes. Desweiteren danke ich Prof. Dr. Arturo Zychlinsky für die Übernahme der offiziellen Betreuung meiner Doktorarbeit, was mir die Promotion an der Humboldt Universität zu Berlin ermöglicht hat. Mein Dank gilt auch Prof. Dr. Ralf Schumann, in dessen Arbeitsgruppe wir uns integrieren durften, für seine Unterstützung und die Möglichkeit seine Räumlichkeiten und Gerätschaften zu nutzen.

Ich bedanke mich bei allen Probanden, die mir über die Jahre fleißig ihr Blut gespendet haben und bei meinen lieben Kollegen, die die Blutabnahmen für mich durchgeführt haben.

Vielen Dank an Frau Petra Schrade für die Präparation der Proben für die Elektronenmikroskopie, sowie ihre Hilfe beim Mikroskopieren. Der Arbeitsgruppe von Frau Dr. Annette Moter danke ich herzlich für die FISH Aufnahmen, die meine Arbeit bereichern haben.

Herzlichen Dank an meine Kollegen vor allem an Frauke Schreiber, die immer eine helfende Hand für mich übrig hatte, wir sind der Kern des Berlin Teams und sind gemeinsam durch Höhen und Tiefen und vier Laborumzüge gegangen. Dr. Kerstin Heyl danke ich für ihre hilfreichen Diskussionen, dem Platz auf dem Sofa und unser Lachen. Vielen Dank auch an Dr. Esther Klaile und Dr. Mario Müller für die Hilfestellung bei der Koimmunpräzipitation und dem Pulldown-Assay, sowie das gewissenhafte Korrigieren meines Manuskriptes für Cellular Microbiology und Dr. Tilman Klassert danke ich für seine frohe, hilfsbereite Art und sein offenes Ohr für jedes statistische und molekularbiologische Problem. Zusätzlich danke ich dem gesamten Berlin Team, der Arbeitsgruppe Schumann und der Arbeitsgruppe Bereswill/Heimesaat für den Zusammenhalt bei den Umzügen, das nette Arbeitsklima und die vielen schönen Mittagspausen.

Nicht zuletzt gilt mein Dank meiner Familie für ihre unendliche Geduld und immerwährende Unterstützung.

11.4 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, die Dissertation selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfen und Hilfsmittel angefertigt zu haben.

Ich habe mich anderwärts nicht um einen Doktorgrad beworben und besitze keinen entsprechenden Doktorgrad.

Ich erkläre, dass ich die Dissertation oder Teile davon nicht bereits bei einer anderen wissenschaftlichen Einrichtung eingereicht habe und dass sie dort weder angenommen noch abgelehnt wurde.

Ich erkläre die Kenntnisnahme der dem Verfahren zugrunde liegenden Promotionsordnung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I der Humboldt-Universität zu Berlin vom 6. Juli 2009.

Weiterhin erkläre ich, dass keine Zusammenarbeit mit gewerblichen Promotionsberaterinnen/Promotions-beratern stattgefunden hat und dass die Grundsätze der Humboldt-Universität zu Berlin zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis eingehalten wurden.

Ort, Datum

Unterschrift des Verfassers